



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JÉSSICA ELEONORA PEDROSO SANCHES SILVEIRA

PERFIL TOXICOLÓGICO DE CONSERVANTES DERIVADOS DE XILITOL EM
COSMÉTICOS

CAMPINAS

2016

JÉSSICA ELEONORA PEDROSO SANCHES SILVEIRA

PERFIL TOXICOLÓGICO DE CONSERVANTES DERIVADOS DE XILITOL EM
COSMÉTICOS

*Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Farmacologia.*

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Mary Luci de Souza Queiroz

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA JÉSSICA ELEONORA PEDROSO
SANCHES SILVEIRA, E ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^a. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si39p Silveira, Jéssica Eleonora Pedroso Sanches, 1980-
Perfil toxicológico de conservantes derivados de xilitol em cosméticos /
Jéssica Eleonora Pedroso Sanches Silveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Mary Luci de Souza Queiroz.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Aditivos em cosméticos. 2. Xilitol. 3. Toxicologia. 4. Medição de risco. 5.
Técnicas *in vitro*. I. Queiroz, Mary Luci de Souza, 1948-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Toxicological profile of xylitol derived preservatives in cosmetics

Palavras-chave em inglês:

Additives in cosmetics

Xylitol

Toxicology

Risk assessment

In vitro techniques

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Mary Luci de Souza Queiroz [Orientador]

Priscila Gava Mazolla

Paulo Cesar Pires Rosa

Flávio Bueno de Camargo Junior

Débora Midori Myaki Pedroso

Data de defesa: 23-02-2016

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JÉSSICA ELEONORA PEDROSO SANCHES SILVEIRA

Orientadora PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ

MEMBROS:

- 1. PROFA. DRA. MARY LUCI DE SOUZA QUEIROZ**
- 2. PROFA. DRA. PRISCILA GAVA MAZZOLA**
- 3. PROF. DR. PAULO CESAR PIRES ROSA**
- 4. PROF. DR. FLÁVIO BUENO DE CAMARGO JUNIOR**
- 5. PROF. DRA. DÉBORA MIDORI MYAKI PEDROSO**

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.

Data: 23 de fevereiro de 2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hélio e Nelma, pela presença.

Aos meus irmãos, Pâmela e Hélio, pelo apoio constante.

Aos meus cunhados, Marcelo e Sirlei, pelo companheirismo.

A minha sobrinha, Alice, pelos momentos de alegria e luz.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai Maior, pela força interior, equilíbrio e me fazer acreditar.

À minha família pela compreensão e pela paciência.

À Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, orientadora deste trabalho, por essa oportunidade e suporte ao meu desenvolvimento intelectual.

À amiga Samara Eberlin pelo incentivo, ajuda e acompanhamento em todo esse trabalho.

À Maria Del Carmen Velazquez Pereda pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Howard Maibach por me auxiliar no meu desenvolvimento científico e me motivar a finalizar esta etapa.

À Nilce Cattassini por me auxiliar a encontrar o caminho e manter a serenidade.

Aos amigos da Natura que, no convívio diário, compartilharam momentos importantes.

Ao Departamento de Farmacologia e ao Hemocentro pela infraestrutura, possibilitando a realização deste trabalho.

À Cecilia Nogueira e ao Gustavo Diemant que contribuíram para o início e desenvolvimento deste trabalho.

À Camila Mariano, Karen Assanome e Lilian Ferreira que auxiliaram nos métodos e resultados deste trabalho.

À equipe da Chemyunion pela amizade, contribuição técnica e apoio a este trabalho.

A todos os amigos por estarem perto com palavras de amizade e entenderem os momentos de ausência.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta fase na minha vida.

*A vida é um raro equilíbrio
entre fazer coisas que sejam
e deixar que as coisas sejam.*

Fernando De Lucca

RESUMO

O aumento das reações adversas causadas por conservantes somado a poucas substâncias disponíveis no mercado têm despertado o interesse das indústrias cosméticas no desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana. Moléculas derivadas de xilitol, Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol, já tiveram sua atividade contra microrganismos comprovada. Entretanto, além de eficazes, estes compostos devem ser seguros para uso em produtos. Neste trabalho, avaliou-se o perfil toxicológico destas moléculas visando sua aplicação cosmética. Inicialmente, foi realizada avaliação preditiva *in silico* dos derivados de xilitol para comparação da toxicidade a partir de substâncias conhecidas e utilizadas em produtos. Testes *in vitro* para avaliação de segurança também foram realizados. Citotoxicidade, fototoxicidade, mutagenicidade e irritação foram os parâmetros estudados para a saúde humana enquanto que se avaliou a biodegradabilidade imediata para saúde ambiental. Adicionalmente, ensaios clínicos de segurança foram realizados para confirmação da tolerância cutânea, da ausência de potencial de sensibilização e da aceitabilidade em condições de uso. Estudos clínicos complementares de eficácia foram feitos para verificar a aplicabilidade dos compostos em formulações cosméticas em relação à melhora de oleosidade, de hidratação, de caspa e ao efeito desodorante. Os resultados obtidos sugerem que as moléculas derivadas de xilitol possuem perfil toxicológico aceitável para formulações cosméticas. Na predição *in silico*, os compostos apresentaram resultados negativos para mutagenicidade, sensibilização e irritação, baixo potencial de permeação e resultados positivos para biodegradabilidade imediata. Nos estudos *in vitro*, nossos resultados demonstraram que as moléculas derivadas de xilitol não são fototóxicas ou mutagênicas e são prontamente biodegradáveis. Porém, apresentaram-se irritantes, provavelmente à atividade conservante por serem moléculas biologicamente ativas. Na avaliação clínica de segurança, os compostos derivados de xilitol demonstraram boa tolerância e aceitabilidade com a pele e não são alergênicos. Além disso, estas substâncias também parecem ter a capacidade de auxiliar nos atributos funcionais dos cosméticos. Formulações contendo Monoéster de C-8 Xilitol melhoram a barreira cutânea e mantêm quantidade de água na epiderme e formulações contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol apresentaram atividade desodorante e melhoraram a oleosidade da pele. Estes resultados contribuem para o desenvolvimento de compostos conservantes seguros para utilização em produtos para o cuidado da pele.

Palavras-chave: Conservantes em Cosméticos; Toxicologia; Avaliação de Risco; Técnicas *in vitro*; Xilitol

ABSTRACT

The increase of adverse effects caused by preservatives together with the lack of available options in the market have arisen cosmetic industries interest in the development of new compounds with antimicrobial action. The effectiveness against microorganisms of Xylitol-derived molecules, Phosphate Xylitol Esters and C-8 Xylitol Monoester, have already been proved. However, these compounds should be safe as well as effective. In this study, the toxicological profile of these molecules was assessed regarding their use in cosmetics. First, *in silico* analysis was performed in order to compare the toxicity prediction of the xylitol-derivatives chemical structures with known substances that are currently used in products. The safety was also tested *in vitro*. Cytotoxicity, phototoxicity, mutagenicity and irritation were the chosen parameters to evaluate the substances hazard for human health. Ready biodegradability was performed to assess the impact on the environment. Moreover, safety clinical trials were performed for the confirmation of skin tolerance, absence of sensitization potential and acceptability under conditions of use. Additional clinical studies for efficacy enabled the assessment of the application of the compounds in cosmetic formulations to improve oiliness, moisturization, dandruff condition and deodorant effect. Our results suggested that xylitol-derived molecules have an acceptable toxicological profile considering their use in cosmetics. Regarding the *in silico* prediction, the compounds presented negative results for mutagenicity, sensitization and irritation, low permeation potentiation and positive results for ready biodegradability. *In vitro* studies results showed that xylitol-derived molecules were not phototoxic or mutagenic and were readily biodegradable. However, they were irritants, probably due to the preservative effect as they are biologically active molecules. In the clinical safety assessment, the compounds presented good skin tolerance and acceptability and they were not allergenic. In addition, these substances also seem to have the capacity of aiding in improving the cosmetic attributes of a formulation. Formulations containing C-8 Xylitol Monoester improved the skin barrier and maintained water amount in the epidermis while formulations containing Phosphate Xylitol Esters presented deodorant activity and improved skin oiliness. These results contribute for the development of safe preservatives for skin care products.

Keywords: Cosmetic Preservatives; Toxicology; Risk Assessment; In vitro Techniques; Xylitol

Figura 1. Molécula de Xilitol.....	34
Figura 2. Isopropilenação do Xilitol.....	37
Figura 3. Monoéster de C-8 Xilitol.....	38
Figura 4. Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	38
Figura 5. Reações Alérgicas a Produtos Cosméticos.....	40
Figura 6. Notação SMILES do Monoéster de C-8 Xilitol.....	46
Figura 7. Notação SMILES do Éster de Fosfato de (Mono) Xilitol.....	47
Figura 8. Notação SMILES do Éster de Fosfato de (Di) Xilitol.....	47
Figura 9. Notação SMILES do Éster de Fosfato de (Tri) Xilitol.....	48
Figura 10. Janela Principal da Ferramenta Toxtree.....	50
Figura 11. Visualização do Resultado da Ferramenta Toxtree.....	51
Figura 12. Ensaio de Citotoxicidade.....	55
Figura 13. Ensaio de Fototoxicidade.....	57
Figura 14. Avaliação de Irritação através do HET-CAM.....	60
Figura 15. Fenômenos observados no HET-CAM.....	61
Figura 16. Esquema do Teste de Ames.....	66
Figura 17: Teste clínico PC5.....	76
Figura 18: Teste clínico de alergenidade – HRIPT	77
Figura 19. Cronograma do HRIPT.....	78
Figura 20. Princípio da medida através do espectroscópio Raman.....	85
Figura 21. Princípio da Medida de Sebumetria.....	89
Figura 22. Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade das moléculas derivadas de xilitol em fibroblastos humanos pelo método de MTT.....	99

Figura 23. Avaliação de citotoxicidade dos Ésteres de Fosfato de Xilitol em fibroblastos humanos após 48 horas de incubação pelo método do MTT.....	100
Figura 24. Avaliação de citotoxicidade Monoéster de C-8 Xilitol em fibroblastos humanos após 48 horas de incubação pelo método do MTT.....	100
Figura 25. Avaliação do potencial fototóxico dos Ésteres de Fosfato de Xilitol em fibroblastos murinos pelo método do vermelho neutro (3T3NRU).....	103
Figura 26. Avaliação do potencial fototóxico do Monoéster de C-8 Xilitol em fibroblastos murinos pelo método do vermelho neutro (3T3NRU).....	103
Figura 27. Resultado do fator de fotoirritação das moléculas derivadas de xylitol..	104
Figura 28. Classificação do potencial irritativo no teste de HET-CAM.....	106
Figura 29. Classificação do potencial irritativo no teste de BCOP.....	107
Figura 30. Porcentagem de CO ₂ liberado nas soluções em função do período de incubação em dias para os Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	109
Figura 31. Porcentagem de CO ₂ liberado nas soluções em função do período de incubação em dias para o Monoéster de C-8 Xilitol.....	109
Figura 32: Efeito na perda de água transepidérmica (TEWL) após 7 dias de aplicação de uma loção hidratante com e sem 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol (n=4).....	115
Figura 33: Perfil hídrico das camadas da pele após aplicação de solução hidratante com e sem Monoéster de C-8 Xilitol (n=1).....	116
Figura 34: Comparação do efeito desodorante de uma solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol com uma solução contendo 3% de Triclosan (n=14).....	117
Figura 35: Efeito na oleosidade da pele durante 28 dias após o uso de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=20).....	119
Figura 36: Efeito na oleosidade durante 28 dias após o uso de um tônico facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=19).....	119
Figura 37: Efeito na oleosidade da pele durante 28 dias após o uso de um shampoo	

e um tônico capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=14).....	120
Figura 38: Efeito na oleosidade da pele do grupo controle (n=14).....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais conservantes utilizados em preparações cosméticas.....	28
Tabela 2. Dados toxicológicos de conservantes do mercado cosmético.....	30
Tabela 3. Propriedades físico-químicas do Xilitol.....	35
Tabela 4. Notação SMILES dos compostos com atividade conservante.....	48
Tabela 5. Distribuição dos Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	53
Tabela 6. Classificação de fototoxicidade em função do PIF.....	58
Tabela 7. Pontuação dos fenômenos observados em função do tempo.....	61
Tabela 8. Classificação do potencial irritante de acordo com a pontuação atingida.....	61
Tabela 9. Escala de irritação para o teste de BCOP.....	63
Tabela 10. Cepas utilizadas no estudo e tipo de mutação detectada.....	63
Tabela 11. Substâncias utilizadas como controle positivo no Teste de Ames.....	65
Tabela 12. Classificação da mutagenicidade de acordo com o MI.....	66
Tabela 13. Testes clínicos de segurança e eficácia realizados.....	69
Tabela 14. Composição do bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	70
Tabela 15. Composição da loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	71
Tabela 16. Composição do shampoo contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	72
Tabela 17. Composição da loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	73
Tabela 18. Composição da solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	73

Tabela 19. Composição da loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol.....	74
Tabela 20. Classificação da compatibilidade cutânea.....	76
Tabela 21. Classificação segundo ICDRG.....	79
Tabela 22. Modo de uso dos produtos no teste de aceitabilidade.....	80
Tabela 23. Classificação da aceitabilidade.....	82
Tabela 24. Pontuação de odor axilar.....	87
Tabela 25: Resultados da predição <i>in silico</i>	93
Tabela 26: Resultados dos ensaios <i>in vitro</i>	94
Tabela 27: Resultados dos estudos clínicos de segurança.....	94
Tabela 28: Resultados dos estudos clínicos para multifuncionalidade.....	95
Tabela 29: Resumo dos resultados da predição <i>in silico</i>	96
Tabela 30: Estimativa da DL ₅₀ em função do IC ₅₀	101
Tabela 31. Valores IC ₅₀ no ensaio de fototoxicidade.....	104
Tabela 32. Classificação em função do índice mutagênico.....	108
Tabela 33. Conclusões dos resultados dos ensaios.....	124

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo de células viáveis no ensaio de citotoxicidade.....	54
Equação 2. Cálculo de morte celular – Fototoxicidade.....	58
Equação 3. Cálculo do fator de fotoirritação.....	58
Equação 4: Cálculo da pontuação de irritação do teste de BCOP.....	62
Equação 5. Princípio de difusão de Fick.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CIR	<i>Cosmetic Ingredient Review</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
ECX	Ésteres de Fosfato de Xilitol
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>
FDA	<i>Food and Drug Agency</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test – Chorioalantoic Membrane</i>
HRIPT	<i>Human Repeated Insult Patch Test</i>
IC50	Concentração inibitória 50%
ICATM	<i>International Cooperation on the Validation of Alternative Methods</i>
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
ICDRG	<i>International Contact Dermatitis Research Group</i>
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredients</i>
IPBC	3-iodo-2-propinilbutilcarbamato
JaCVAM	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i>
JECFA	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i>
KoCVAM	<i>Korean Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
LD50	Dose letal 50%
MCX	Monoéster de C-8 Xilitol
MI	<i>Mutagenicity Index</i>
MI	Metilisotiazolinona
MIC	Metilcloroisotiazolinona
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium
NOAEL	<i>Non-observed adverse effect level</i>

NRU	<i>Neutral Red Uptake</i>
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PC5	<i>Pli du coude – 5 jours</i>
PIF	Fator de Indução de Fototoxicidade
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
START	<i>Structure Alerts for Reactivity in Toxtree</i>
TEWL	Perda de Água Transepidérmica
TTC	<i>Threshold of Toxicological Concern</i>
QSAR	<i>Quantitative Structure-Relationship Activity</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Justificativa.....	24
1.2. Revisão da Literatura.....	24
1.2.1. Substâncias Conservantes.....	26
1.2.2. Xilitol.....	34
1.2.3. Moléculas derivadas de xilitol.....	36
1.2.4. Avaliação toxicológica de compostos e produtos cosméticos.....	39
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. METODOLOGIA.....	46
3.1. Estudos pré-clínicos.....	46
3.1.1. Predição <i>in silico</i> para avaliação da segurança.....	46
3.1.1.1. Moléculas escolhidas para avaliação <i>in silico</i>	46
3.1.1.2. Avaliação <i>in silico</i> dos parâmetros relacionados à saúde humana.....	49
3.1.1.3. Avaliação <i>in silico</i> da biodegradabilidade imediata.....	51
3.1.1.4. Análise estatística da avaliação <i>in silico</i>	52
3.1.2. Moléculas derivadas de xilitol para estudos <i>in vitro</i>	52
3.1.3. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	53
3.1.3.1. Cultura de células.....	53
3.1.3.2. Linhagem de fibroblastos humanos.....	53
3.1.3.3. Ensaio de Viabilidade celular/ Efeito citotóxico.....	54
3.1.4. Fototoxicidade <i>in vitro</i>	55
3.1.4.1. Linhagem de fibroblastos murinos.....	55
3.1.4.2. Ensaio de fototoxicidade.....	56
3.1.5. Potencial irritativo <i>in vitro</i>	58
3.1.5.1. Avaliação da irritação ocular - HET-CAM (Teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha).....	58
3.1.5.1.1. Preparação do produto teste.....	59
3.1.5.1.2. Preparação dos ovos.....	59

3.1.5.1.3.Determinação do potencial irritante.....	59
3.1.5.2.Avaliação da irritação ocular - BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability Test).....	62
3.1.6. Potencial mutagênico <i>in vitro</i>	63
3.1.6.1. Linhagens utilizadas.....	63
3.1.6.2. Preparo do sistema de ativação metabólica S9.....	64
3.1.6.3. Controles do teste de Ames.....	64
3.1.6.4. Ensaio de mutagenicidade.....	65
3.1.7. Biodegradabilidade imediata <i>in vitro</i>	66
3.1.8. Análise estatística dos estudos <i>in vitro</i>	67
3.2. Estudos clínicos.....	68
3.2.1. Formulações para os estudos clínicos.....	68
3.2.1.1 Bálsamo pós-barba – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%).....	69
3.2.1.2. Loção Tônica Capilar – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%).....	70
3.2.1.3. Shampoo – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%).....	71
3.2.1.4. Loção Tônica Facial – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%).....	72
3.2.1.5. Solução – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%).....	73
3.2.1.6. Loção Hidratante – Monoéster de C-8 Xilitol (1,5%).....	74
3.2.2. Aspectos Éticos.....	74
3.2.3. Estudos clínicos de Segurança.....	75
3.2.3.1. Compatibilidade cutânea.....	75
3.2.3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.....	77
3.2.3.1.2. Restrições do estudo.....	77
3.2.3.2. Potencial alergênico	77
3.2.3.2.1. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.....	79
3.2.3.2.2. Restrições do estudo.....	80
3.2.3.3. Aceitabilidade cutânea e ocular.....	80
3.2.3.3.1. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.....	82

3.2.3.3.2. Critérios de inclusão para o Bálsamo Pós Barba.....	83
3.2.3.3.3. Critérios de inclusão para a Loção Facial.....	83
3.2.3.3.4. Critérios de inclusão para o Shampoo e a Loção Tônica Capilar.....	83
3.2.3.3.5. Restrições do estudo.....	83
3.2.3.3.6. Análise estatística.....	83
3.2.4. Estudos clínicos de multifuncionalidade.....	84
3.2.4.1. Manutenção da hidratação.....	84
3.2.4.1.1. Teste de TEWL (<i>Transepidermal Water Loss</i>).....	84
3.2.4.1.1.1. Análise estatística.....	85
3.2.4.1.2. Avaliação do efeito potencial na hidratação da pele através do método Raman.....	85
3.2.4.1.2.1. Teste de hidratação da pele através do método Raman.....	85
3.2.4.1.3. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.....	86
3.2.4.1.4. Restrições do estudo.....	86
3.2.4.2. Atividade desodorante.....	86
3.2.4.2.1. Sniff-test.....	86
3.2.4.2.2. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.....	87
3.2.4.2.3. Restrições do estudo.....	88
3.2.4.2.3. Análise estatística.....	88
3.2.4.3. Redução de oleosidade.....	88
3.2.4.3.1. Teste de sebumetria.....	88
3.2.4.3.2. Análise estatística.....	89
3.2.4.4. Avaliação da Apreciabilidade Cosmética.....	90
3.2.4.4.1. Teste de Apreciabilidade Cosmética.....	90
3.2.4.4.2. Análise estatística.....	92
4. RESULTADOS.....	93
5. DISCUSSÃO.....	96
5.1. Estudos pré-clínicos.....	96
5.1.1. Predição <i>in silico</i> para avaliação da segurança.....	96

5.1.2. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	99
5.1.3. Fototoxicidade <i>in vitro</i>	101
5.1.4. Potencial irritativo <i>in vitro</i>	105
5.1.4.1. Avaliação da irritação ocular - HET-CAM (Teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha).....	105
5.1.4.2. Avaliação da irritação ocular - BCOP (<i>Bovine Corneal Opacity and Permeability Test</i>).....	106
5.1.5. Potencial mutagênico <i>in vitro</i>	107
5.1.6. Biodegradabilidade imediata <i>in vitro</i>	108
5.2. Estudos clínicos de segurança.....	110
5.2.1. Compatibilidade cutânea.....	110
5.2.2. Potencial alergênico.....	111
5.2.3. Aceitabilidade cutânea e ocular.....	112
5.2.3.1. Aceitabilidade cutânea de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	112
5.2.3.2. Aceitabilidade cutânea e ocular de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	112
5.2.3.3. Aceitabilidade cutânea e ocular de uma loção tônica capilar e um shampoo contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	113
5.3. Estudos clínicos de multifuncionalidade.....	114
5.3.1. Manutenção da hidratação.....	114
5.3.1.1. Teste de TEWL de uma loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol.....	114
5.3.1.2. Avaliação do efeito potencial na hidratação da pele de uma loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol através do método Raman.....	116
5.3.2. Atividade desodorante.....	117
5.3.3. Redução de oleosidade.....	117
5.3.3.1. Oleosidade da pele após o uso de formulações contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	118
5.3.4. Apreciabilidade Cosmética.....	121
5.3.4.1. Apreciabilidade Cosmética de produtos contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	121
5.3.4.2. Apreciabilidade Cosmética de um shampoo e uma loção tônica	

capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	121
5.3.4.3. Apreciabilidade Cosmética de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	122
5.3.4.4. Apreciabilidade Cosmética de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.....	122
6. CONCLUSÃO.....	124
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
8. APÊNDICES.....	143
9. ANEXOS.....	172

1.1. Justificativa

Conservantes são substâncias adicionadas aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade de prevenir o crescimento de microrganismos durante sua fabricação, estocagem e durante o uso.

Não existe um conservante ideal que apresente atividade de amplo espectro e que seja compatível com os diversos tipos de formulações. Além disso, todos os agentes conservantes utilizados atualmente têm demonstrado causar algum risco à saúde, sendo que, juntamente com as fragrâncias, estes compostos são os maiores responsáveis pela ocorrência de dermatites de contato.

Portanto, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos multifuncionais com atividade antimicrobiana, ou seja, opções alternativas aos conservantes tradicionais que sejam eficazes, seguras e que apresentem benefícios adicionais às formulações.

1.2. Revisão da Literatura

A maioria dos cosméticos, por conterem alta concentração de água, podem ser contaminados por microrganismos, os quais podem alterar a composição do produto ou apresentar um risco ao consumidor (1).

A contaminação microbiológica de cosméticos tornou-se uma preocupação há aproximadamente 50 anos, sendo que os primeiros casos envolviam fungos. Para combater este problema, os ésteres de ácido benzóico (parabenos) eram adicionados às formulações e forneciam proteção suficiente. Entretanto, durante os anos 60, aumentou a demanda por conservantes mais eficazes devido à contaminação de produtos por *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Pseudomonas* ssp (2). Em meados dos anos 70, os cosméticos para os olhos foram alvo de investigação devido ao fato de que muitos casos de cegueira ocorreram em função de contaminação de máscara para cílios por *Pseudomonas* (3).

Neste sentido, as Boas Práticas de Fabricação (BPF), provenientes da indústria farmacêutica, foram introduzidas juntamente com a regulamentação dos conservantes resultando na diminuição da contaminação de cosméticos(1).

Os produtos devem chegar ao consumidor final em boa condição microbiológica, mas podem sofrer alterações durante o seu uso. A contaminação apresenta um risco potencial à qualidade de produtos, podendo acarretar a separação de fases emulsionadas, alteração de coloração, produção de gases e odores e, sobretudo, afetar a saúde do consumidor (3-5). Por esta razão, a segurança microbiológica de produtos cosméticos sempre teve atenção importante das indústrias (6).

A contaminação pode ser originária das matérias-primas, da água da formulação ou pode ocorrer acidentalmente durante o uso do produto. Desta maneira, os conservantes utilizados em produtos cosméticos podem não promover a adequada conservação do produto, de acordo com os níveis estabelecidos pelos órgãos regulatórios. Por isso, têm se buscado novos compostos que possam conferir propriedades antimicrobianas adicionais (7).

Portanto, sistemas conservantes devem assegurar a proteção das formulações de forma estável, sendo compatível com outros ingredientes, ter um amplo espectro de ação em baixa concentração e ativo numa larga faixa de pH, além de não provocar efeitos tóxicos, irritantes e hipersensibilizantes (8). Entretanto, poucos agentes se aproximam deste ideal, e todos, sem exceção, têm demonstrado causar dermatites de contato (9-17).

Em relação aos produtos cosméticos, estima-se que aproximadamente 12% da população apresenta efeitos adversos a estes produtos, especialmente dermatites de contato, sendo que os conservantes e as fragrâncias são os compostos mais frequentemente responsáveis por estas reações (11, 16, 18 - 20). Considerando que todos os agentes conservantes utilizados atualmente têm demonstrado causar algum risco de sensibilização, esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de compostos com atividade antimicrobiana, fazendo-se necessárias opções alternativas cada vez mais eficazes, seguras e que apresentem benefícios adicionais às formulações (ingredientes multifuncionais)(6).

Visto que os conservantes em contato direto da pele podem resultar em irritação ou sensibilização cutânea, todas as novas moléculas devem passar por

análise toxicológica para caracterização do perigo e avaliação do risco para o uso pretendido. De modo geral, o fabricante deve realizar estudos iniciais de segurança, considerando irritação ocular, cutânea e sensibilização. Após o resultado destes estudos e com o conhecimento de aplicações da molécula e dados de exposição, estudos adicionais devem ser indicados para uma avaliação toxicológica completa (21). Entretanto, visto que produtos cosméticos não devem ser testados em animais e há também movimentos para o banimento total destes testes em matérias-primas, os toxicologistas vêm utilizando metodologias de avaliação computacional da relação estrutura-atividade (QSAR) e ensaios *in vitro* a fim de adquirir os dados necessários para o processo de avaliação de segurança (22).

Além disso, há restrições regulatórias e de segurança para a utilização de conservantes mais eficazes, fazendo com que os formuladores tenham que utilizar misturas de conservantes a fim de obter a necessária proteção e minimizando o risco de eventos adversos através da redução dos níveis das concentrações das matérias-primas isoladas (23).

1.2.1. Substâncias Conservantes

Conservantes são agentes químicos adicionados aos Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, os quais não são estéreis, com a finalidade de prevenir o crescimento de microrganismos durante sua fabricação e estocagem, ou para proteger os produtos da contaminação inadvertida durante o uso (12).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (24). Para a proteção contra microrganismos destas formulações e, conseqüentemente, dos usuários, conservantes são adicionados.

A descoberta de substâncias conservantes melhorou a qualidade dos produtos e influenciou de forma positiva a saúde pública mundial diminuindo infecções e contaminações (25, 26).

Embora os índices de contaminação tenham diminuído drasticamente, os índices de irritação e sensibilização decorrente do uso de produtos aumentaram. Assim, a utilização de produtos também pode estar relacionada com eventos adversos. As reações mais comuns em função da aplicação tópica são irritação, coceira e dermatites (27).

A regulamentação deve ser o primeiro aspecto observado na escolha do conservante. No Brasil, a Resolução RDC N° 29, de 1º de junho de 2012, determina quais as substâncias permitidas e as concentrações de uso consideradas seguras para utilização nos produtos através da “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” (28). A regulamentação varia de país para país. No Brasil, há 57 substâncias permitidas enquanto que na Europa, a lista contempla 59 conservantes. Entretanto, poucos apresentam ampla atividade antimicrobiana, o que estimula o uso de associações (29).

A segunda etapa para seleção do sistema conservante é conhecer suas propriedades físico-químicas para se prevenir possíveis incompatibilidades com os componentes da fórmula e até de inativação do conservante.

O conservante adequado deve apresentar atividade de amplo espectro, ou seja, inibir o crescimento de fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas com a menor dosagem possível.

Apesar da água ser a principal fonte de contaminação de produtos, ela pode também ser proveniente das matérias-primas utilizadas na formulação, as quais podem ser facilmente degradáveis pelos microrganismos, e estudos demonstraram que os sistemas conservantes usualmente empregados não são capazes de fornecer proteção adequada. Há, portanto, necessidade de desenvolver novos compostos com propriedades antimicrobianas (1, 7).

A utilização dos conservantes é uma forma de proteção importante às formulações, pois um produto cosmético entra frequentemente em contato com o ambiente, a pele humana e com os olhos. Além de proteger o usuário, a utilização destas substâncias colabora com a manutenção da estabilidade da formulação, pois

a degradação através dos microrganismos pode resultar na alteração das características físico-químicas do produto, como cor, odor e textura (30).

Não existe um conservante ideal que seja totalmente eficaz na prevenção de crescimento de microrganismos em produtos, sendo necessária a utilização de uma combinação de componentes com ação antimicrobiana. Um bom sistema conservante deve apresentar atividade de amplo espectro e deve ser efetivo nas menores concentrações possíveis de cada composto.

Embora a lista de conservantes permitidos no Brasil apresente mais de 50 opções, somente alguns são utilizados mais frequentemente na maioria dos produtos (Tabela 1). Isto se deve ao fato de que o sistema conservante deve ser compatível com a formulação, estável a variações de temperatura e pH (31) e ter custo acessível para ser utilizado em vários produtos.

Tabela 1: Principais conservantes utilizados em preparações cosméticas (8)

Conservantes	Concentrações usuais (%)
Parabenos	0,8
Formaldeído	0,1 – 0,2
Quaternium-15	0,02 – 0,3
Imidazolidinil uréia	0,03 – 0,2
2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol (bronopol)	0,1
Metilcloroisotiazolinona (MIC)	0,0015
Metilisotiazolinona (MI)	0,0015 -0,01
Fenoxietanol	1
Sorbato de Potássio	0,6
Triclosan	0,3
DMDM-Hidantoína	0,6
Poliamidopropil Biguanida	0,3
3-iodo-2-propinil-butilcarbamato (IPBC)	0,1

Além disso, a segurança das substâncias conservantes vem sendo questionada não somente pela comunidade científica, mas também por um crescente número de consumidores (6), especialmente através de mídias sociais e sites.

A maioria dos conservantes que causam dermatite de contato são utilizados tanto em produtos para cuidado pessoal quanto para produtos de uso ocupacional, não sendo possível evitar a exposição da pele a estes agentes e prevenir alergias (32).

Segundo Wilkinson, 2002, taxas de dermatites de contato alérgicas obtidas em testes clínicos de até 1% são aceitáveis, 2% são preocupantes e acima de 3% indicam sérios problemas (14).

Recentemente, o formaldeído começou a ser utilizado em produtos para alisamento capilar. Assim, a exposição a este composto aumentou significativamente e novos dados em relação a sua toxicidade foram demonstrados na literatura. Este composto é reconhecido por seu potencial carcinogênico para humanos. O formaldeído foi classificado pela IARC (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer), pertencendo ao grupo 1 (Carcinogênico para humanos) em 2006. Apesar de sensibilizante e irritante, é permitido em cosméticos em baixas concentrações. Entretanto, a maioria das indústrias vêm substituindo esta substância por outros conservantes.

Adicionalmente, os conservantes classificados como liberadores de formaldeído também são alvo de preocupação. Liberadores de formaldeído são altamente solúveis em água, estáveis e ativos em ampla faixa de pH, sendo efetivos contra leveduras, fungos filamentosos e bactérias, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*. Embora questionados, estudos indicam 1% de sensibilização com estes compostos (8, 33).

Em 2012, a empresa Johnson & Johnson sofreu grande pressão por conter, em um shampoo destinado para bebês, o conservante Quaternium-15, tendo que retirá-lo de seus produtos. A escolha de conservantes para produtos infantis é um desafio ainda maior, pois devido aos perigos relacionados às moléculas com propriedades antimicrobianas, muitas não podem ser utilizadas (34).

Os parabenos foram introduzidos em cosméticos nos anos 30 na concentração de 0,1% a 0,8%. Em função da diferença de solubilidade dos compostos desta classe, seu uso se dá de forma associada, sendo mais efetivos contra fungos do que bactérias (35, 36). Estudos na Europa e nos EUA indicaram variação de 0 a 3,5% nas taxas de sensibilização em relação aos parabenos (37, 38). Entretanto, um estudo mais recente demonstrou taxas entre 0,5% e 1% (12).

O sistema conservante metilcloroisotiazolinona e metilisotiazolinona foi introduzido na Europa em 1970 e nos EUA em 1980. Já em 2005, dados europeus demonstravam nível preocupante de sensibilização, 2 a 3% (12). Atualmente, o seu uso em cosméticos já é restrito, sendo que em alguns países não pode ser usado em produtos não enxaguáveis, tais como hidratantes e maquiagens.

Na tabela 2 estão descritos algumas das substâncias com ação conservante mais frequentemente utilizadas nos produtos cosméticos (30):

Tabela 2: Dados toxicológicos de conservantes do mercado cosmético

Nomenclatura INCI / Português	Dados Toxicológicos
DMDM Hydantoin/ DMDM- Hidantoína	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,6%. LD50 (oral, ratos): 2000mg/kg. Não foram observados efeitos teratogênicos em solução com 55% do conservante em estudos com coelhos. Irritação ocular leve em 0,5% foi observada em coelhos albinos. Irritante cutâneo leve a moderado em concentrações até 1% em humanos e coelhos. Estudos epidemiológicos demonstraram que este conservante apresenta potencial sensibilizando a 0,7%. Até 0,25% não foi detectado potencial fototóxico em estudo em humanos. Apesar de ser seguro para uso cosmético até 1% de acordo com o CIR (39), é um liberador de formaldeído.
Iodopropynyl Butylcarbamate/ Iodopropinil Butilcarbamato (IPBC)	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,02% (produtos enxaguáveis), 0,01% (produtos não enxaguáveis) e 0,0075% (antiperspirantes). Não é permitido em produtos aplicados em grandes áreas e mucosas devido à liberação de iodo. LD50 (oral, ratos): 1580mg/kg. Não é considerado carcinogênico. Irritante ocular severo em coelhos. Irritante cutâneo leve em coelhos (100%) e em humanos (4%). Possui potencial sensibilizante conforme relatos de caso na literatura. Não há dados que indiquem potencial fototóxico (5% em cobaias e 0,125% em humanos). NOAEL (toxicidade na reprodução, oral, ratos): 20mg/kg bw/day (40).
Benzoic Acid/ Ácido Benzoico	A concentração máxima permitida em cosméticos é 2,5% (produtos enxaguáveis), 1,7% (produtos de cuidado bucal) e 0,5% (produtos não enxaguáveis). LD50 (rato, oral): 1700mg/kg. O uso em cosméticos foi considerado seguro pelo CIR até 5%. Não se mostrou carcinogênico em ratos (1%). Irritante ocular em ratos e irritante ocular severo em coelhos. Irritante cutâneo leve em coelhos e moderado em humanos. Estudos em animais e humanos indicaram que 2% não apresenta potencial sensibilizante, entretanto há relatos na literatura de resultados positivos em testes de

	contato. Não há relatos de potencial fototóxico. NOAEL (dérmico, coelhos): 2500mg/kg bw/day (41).
Benzyl Alcohol/ Álcool Benzílico	A concentração máxima permitida em cosméticos como conservante é 0,3%. LD50 (oral, ratos) = 1610 mg/kg. Não é mutagênico. É um irritante ocular a 4% em coelhos e um irritante cutâneo leve. Não possui potencial fototóxico. NOAEL (oral, ratos): 400mg/kg bw/day (41).
Chlorphenesin/ Clorfenesina	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,3%. LD50 (oral, ratos): 3000mg/kg. O uso em cosméticos foi considerado seguro pelo CIR até 0,3%. É um irritante ocular fraco a 1% em coelhos e é irritante cutâneo nesta mesma concentração. Não apresentou potencial sensibilizante em cobaias a 1% e em humanos a 9%. Não apresenta potencial fototóxico. NOAEL (oral, ratos): 10mg/kg bw/day (42)
Dehydroacetic acid/ Ácido deidroacético	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,6%. LD50 (oral, ratos): 1000mg/kg. É utilizado como conservante de alimentos. Não apresenta potencial carcinogênico ou teratogênico. Em estudo em coelhos (Draize test), apresentou irritação leve. Não é considerado irritante cutâneo. Possui baixo potencial sensibilizante e fotossensibilizante (43, 44).
Formaldehyde/ Formaldeído	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,2% (conservante). LD50 (oral, ratos): 800mg/kg Possui potencial carcinogênico, mutagênico e genotóxico. Não é teratogênico. É irritante ocular em baixas concentrações. Também é irritante cutâneo. Apresenta potencial sensibilizante em concentrações acima de 0,2%. NOAEL (camundongo, dérmico): 2,5 mg/kg bw/ day (45, 46).
Imidazolidinyl urea/ Imidazolidinil uréia	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,6%. É um liberador de formaldeído. LD50 (dérmico, ratos): 5,2g/kg. Não é teratogênico. Em concentrações inferiores a 5% não é irritante, sensibilizante ou fototóxico. NOAEL: 600mg/kg bw/day (47, 48, 49).
Methylisothiazoli none/ Metilisotiazolinon a	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,01%. LD50 (oral, camundongos): 141mg/kg. Não é considerado carcinogênico ou tóxico para a reprodução. É corrosivo e irritante cutâneo e ocular em altas concentrações. Apresenta potencial sensibilizante e foi considerado o alérgeno do ano de 2013 pela Sociedade Americana de Dermatite de Contato. Não apresenta potencial fototóxico (50, 51, 52, 53, 54).
Phenoxyethanol/ Fenoxietanol	A concentração máxima permitida em cosméticos é 1%. LD50 (oral, ratos): 1260mg/kg. É considerado seguro para uso em cosméticos até 1%, conforme parecer do CIR. Não é tóxico na reprodução É um irritante ocular severo e é um irritante cutâneo leve. Não é sensibilizante ou fototóxico. NOAEL: 500mg/kg bw/day (55, 56).

Parabens/ Parabenos	Grupo de ésteres derivados do ácido para-aminobenzóico (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno e benzilparabeno). A concentração máxima permitida é de 0,4% (como ácido) para uso de apenas um éster e 0,8% (como ácido) em caso de uso em combinação. Estudos de toxicidade aguda, sub-crônicos e crônicos em animais indicam que estes compostos não são significativamente tóxicos. Parabenos, em geral, não são mutagênicos e apesar de demonstrar atividade estrogênica, esta é inferior à do estradiol. Em pele íntegra, parabenos são praticamente não irritantes e não sensibilizantes. NOAEL: 1000mg/kg bw/day (57).
Quaternium-15/ Quaternium-15	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,2%. É um liberador de formaldeído. É irritante cutâneo leve e ocular moderado. Em estudos em animais, foi considerado sensibilizante. Não é genotóxico. Demonstrou-se teratogênico quando administrado oralmente em estudos em animais, entretanto, não possui esta atividade quando administrado por via dérmica (58).
Sorbic acid/ Ácido Sórbico	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,6%. LD50 (oral, ratos): 7360mg/kg. É considerado seguro para uso em cosméticos até 5%, conforme parecer do CIR. Não é teratogênico a 10%. Há relatos na literatura a respeito do potencial irritativo cutâneo e também sobre casos de sensibilização. NOAEL: 25mg/kg bw/day (59, 60).
Triclosan/ Triclosan	A concentração máxima permitida em cosméticos é 0,3% e 0,2% (enxaguatório bucal). LD50 (oral, ratos) \geq 3700mg/kg. Não é considerado genotóxico ou carcinogênico. Além disso, não há evidências de que seja teratogênico. É irritante cutâneo e ocular moderado. Não é sensibilizante e fototóxico. NOAEL: 10mg/ kg bw/ day (61, 62). É considerado tóxico ao meio ambiente (63).

Estes compostos agem por diversos mecanismos, como modificação e permeabilidade da membrana com extravasamento dos constituintes celulares, precipitação de proteínas, inibição do metabolismo celular pela interferência nos sistemas enzimáticos ou inibição da síntese da parede celular e oxidação dos componentes celulares (31).

Devido às propriedades sensibilizantes destas substâncias, elas vêm sendo adicionadas às baterias de contato dermatológicas, tais como formaldeído, metilisotiazolinona e os parabenos. O impacto dos conservantes na sensibilização é frequentemente avaliado através de teste de contato (*patch test*) e a conclusão global é que há necessidade de introdução de novas moléculas no mercado a fim de

diminuir a exposição aos compostos tradicionais, diminuindo assim os quadros de alergias (64).

Entretanto, as opções alternativas de conservantes de produtos têm, usualmente, alto custo e, portanto, há uma tendência na busca de substâncias com ação antimicrobiana (65).

Recentemente, surgiu no mercado o conceito de formulações livre de conservantes, ou seja, produtos que não contêm substâncias com propriedades antimicrobianas classificadas como tal pela legislação e sua principal função não é conservar a formulação, mas possuem a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos. Caprilil Glicol, alguns ácidos graxos e seus monoésteres, Álcool Fenetílico, Etilxilglicerina e óleos essenciais têm sido empregados como alternativa conservante em produtos cosméticos (6).

A tendência é utilizar substâncias que tenham propriedades conservantes. Os compostos multifuncionais, tais como derivados de plantas ou substâncias sintéticas, vêm sendo estudados por sua capacidade de impedir o crescimento de microrganismos em preparações cosméticas. Através de uma seleção cuidadosa, é possível diminuir ou eliminar o uso dos conservantes tradicionais e melhorar a taxa de reação adversa decorrente do uso destes compostos (23).

O Caprilil Glicol ou 1,2-Octanediol é um diol linear C8 com propriedades hidratantes. Este composto começou a ser utilizado nos anos 90, mas sua aplicação em formulações vem aumentando nos últimos anos a fim de melhorar o controle do crescimento de microrganismos em combinação com outros conservantes. Adicionalmente, apresenta baixa toxicidade e, segundo estudos em animais, não tem potencial sensibilizante em concentrações de 5% a 50% (66).

Outro composto utilizado em produtos cosméticos por sua atividade conservante é o Álcool Fenetílico. Ocorre naturalmente em algumas plantas e é utilizado como componente de fragrância. É classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA, ou seja, possui baixa toxicidade. Entretanto, dados de estudos em animais demonstraram o potencial teratogênico desta substância. O uso do Álcool Fenetílico é permitido até a 1% em produtos finais (56, 67).

Etilxilglicerina é um agente condicionante da pele que também possui ação conservante. É quimicamente classificado como um éster gliceril alquil.

Comercialmente disponível com o nome de Sensiva SC50 é utilizado em combinação com fenoxietanol, metilisotiazolinona e metilparabeno por aumentar a atividade conservante. Tem baixo potencial de permeação dérmica, conforme estudo *in vitro*, mas sua toxicidade inalatória é ainda discutida (68).

Óleos essenciais também vêm sendo empregados para conservar produtos cosméticos. Embora a origem natural não assegure um melhor perfil dermatológico e toxicológico, é esperada uma melhora da biodegradabilidade (69, 70), sendo este um parâmetro importante para a avaliação do risco ambiental dos compostos.

Os dados controversos que vêm sendo publicados sobre os conservantes tradicionais em combinação com o aumento do desejo do consumidor por produtos naturais têm levado a indústria a buscar novos métodos de conservação para os produtos. Entretanto, a utilização destas substâncias alternativas ou naturais não resulta na eliminação completa de eventos adversos, reações de irritação ou sensibilização. Enquanto a solução ideal ainda não é encontrada, a alternativa é estudar cada vez mais compostos a fim de disponibilizar a maior quantidade de opções no mercado (6).

1.2.2. Xilitol

Derivados de açúcares são frequentemente adicionados a produtos alimentícios para inibir o crescimento bacteriano (71). O xilitol (Figura 1) é um açúcar com 5 moléculas de carbono e 5 grupos hidroxila que ocorre livremente em certas partes das plantas, tais como frutas, e no metabolismo humano. Devido à capacidade deste poliol formar complexos com o cálcio e outros cátions polivalentes, contribui para a remineralização dos dentes e lesões das cáries dentárias e é, portanto, utilizado na área odontológica. Além de ser anticariogênico, possui gosto agradável e propriedades de adoçar semelhantes às da sucrose (72).

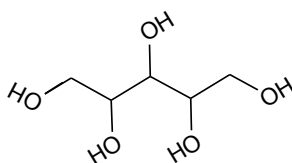


Figura 1: Molécula de Xilitol

É um produto intermediário do metabolismo da glicose e é rapidamente excretado na urina. Quando ingerido, estimula a atividade da enzima não específica poliol desidrogenase e é vagarosamente absorvido e metabolizado principalmente em ácidos graxos de cadeia curta, a maioria deles absorvidos e utilizados pelo organismo (73, 74).

A segurança do xilitol já foi avaliada por várias autoridades regulatórias. Por exemplo, em 1983, o JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*) das duas agências FAO (*Food and Agriculture Organization*) e WHO (*World Health Organization*) dos EUA considerou como “não especificada” a dose diária aceitável (ADI) desta substância, ou seja, não há limites de consumo. É classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) e estudos demonstraram sua baixa toxicidade com LD50 (dose letal média) de 25,7g/kg de peso corpóreo em ratos quando administrado oralmente. Em preparações cosméticas nas concentrações 5 e 10% não foi considerado irritante em estudos em animais (75, 76). O xilitol possui especificação comparável à do sorbitol (Tabela 3) e o parecer do comitê americano indicou a não necessidade de estudos toxicológicos adicionais. Adicionalmente, em 1986, a FASEB (*Federation of American Societies for Experimental Biology*) publicou um relatório indicando a segurança do xilitol (77).

Tabela 3: Propriedades físico-químicas do Xilitol (66)

Peso Molecular	152,15 g/mol
Fórmula Molecular	C ₅ H ₁₂ O ₅
Propriedades Organolépticas	Cristais com sabor adocicado similar ao da sucrose.
Ponto de ebulição	216°C
Ponto de fusão	93,5 °C
Solubilidade	Muito solúvel em água e álcool
Pressão de Vapor	2,47x10 ⁻³ mmHg a 25 °C
LogKoW	-2,56
Estabilidade	Estável, mas higroscópico. Caramelização pode ocorrer se aquecido próximo ao ponto de ebulição. Em pó, há tendência a aglomeração. Soluções aquosas são estáveis.

Com base nestas avaliações, o xilitol é utilizado em produtos para higiene oral e para cuidado bucal, tais como gomas de mascar e balas (79).

O xilitol é capaz de modificar o ambiente externo e as estruturas de organismos patogênicos, diminuindo a habilidade destes microrganismos de aderir nas células epiteliais e na superfície dos tecidos, reduzindo o risco de infecção. Devido a estas propriedades de inibição de crescimento de bactérias, como por exemplo *Streptococcus pneumoniae*, a aplicação do xilitol como auxiliar na dieta de crianças e para prevenção de otite vem sendo estudada (80, 81). Inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (82, 83). Este composto a 5% é também capaz de reduzir os níveis de aderência de *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* no epitélio de células nasofaríngeas (84). Adicionalmente, o potencial de inibição do crescimento de *S. mutans*, o microorganismo mais frequentemente envolvido em cáries dentais, também já foi descrito na literatura (85).

De acordo com a literatura, a toxicidade do xilitol é baseada no acúmulo de xilitol fosfato no interior do microrganismo. Ele é transportado e fosforilado por fosfoenolpiruvato na célula (86, 87).

Entretanto, a molécula de xilitol não é capaz de promover sozinha uma completa conservação e mudanças em sua estrutura podem gerar compostos com melhor atividade antimicrobiana. Recentemente, o Monoéster de C-8 Xilitol e os Ésteres de Fosfato de Xilitol apresentaram eficácia contra contaminantes de formulações cosméticas (2, 71).

1.2.3. Moléculas derivadas de xilitol

Ésteres de açúcares, tais como glicerol e sucrose, são utilizados em alimentos como emulsificantes ou agentes estabilizadores. Além disso, estes compostos também são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas (86).

Também já foi demonstrado que a fosforilação do xilitol resultando em xilitol fosfato é necessária para que a ação contra microrganismos ocorra, pois açúcares fosforilados que não podem ser catabolizados, geralmente, são tóxicos para as células (87).

Neste sentido, pensando nas possibilidade de potencialização do efeito conservante através da adição de fosfato e C-8, duas moléculas foram sintetizadas, gerando ésteres de fosfato de xilitol e monoéster de C-8 xilitol.

A atividade conservante do monoéster de C-8 xilitol já foi descrita na literatura. Embora ainda não publicado, ésteres de fosfato de xilitol também apresentam atividade conservante. Ambos os componentes tem potencial para utilização em formulações cosméticas (2).

O processo de síntese das moléculas derivadas de xilitol ocorre a partir da condição de isopropilenação a qual o xilitol é submetido, conforme Zarif et al, 1990 (88) (figura 2). Formam-se acetonidas, principalmente diacetonida, originárias da acetona anidra com sulfato de cobre adicionado através da reação catalisada por ácido sulfúrico. Os compostos formados são separados por coluna cromatográfica e as diacetonidas são submetidas a esterificação por cloreto de octanol (para obtenção do Monoéster de C-8 Xilitol) ou cloreto de fosforila (para obtenção dos ésteres de fosfato de xilitol). Após tratamento com ácido trifluoroacético e água, tem-se o composto de interesse (figura 3 e 4).

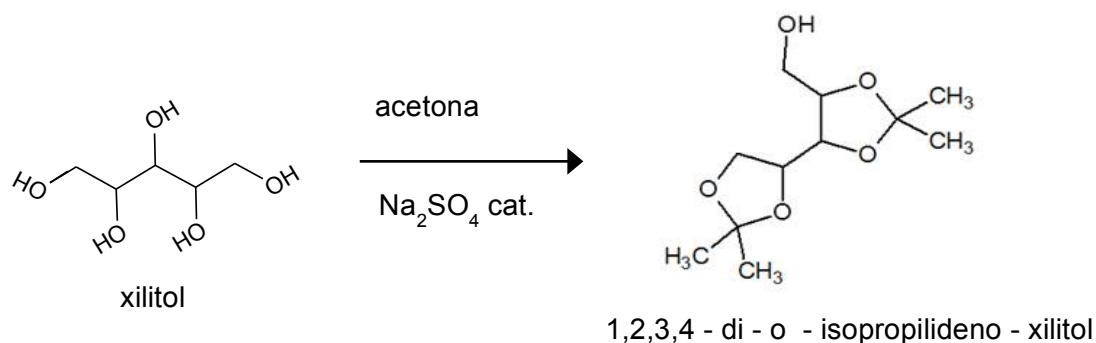


Figura 2: Isopropilenação do Xilitol

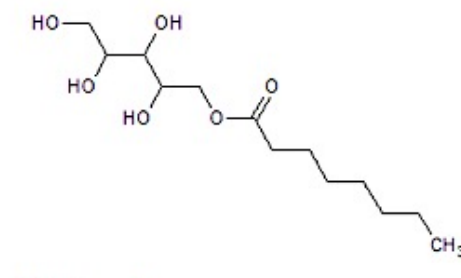


Figura 3: Monoéster de C-8 Xilitol

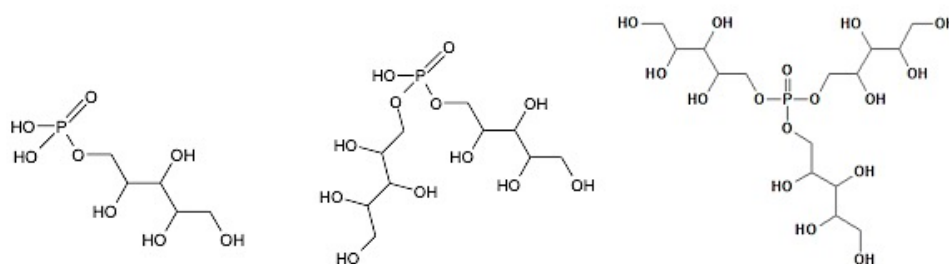


Figura 4: Ésteres de Fosfato de Xilitol

Os compostos foram caracterizados por métodos de espectroscopia e cromatográficos (CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência), os quais indicam a sua pureza.

Patentes foram depositadas para ambos os compostos:

- WO2010046726: Xylitol esters and ethers applied as alternative emulsifiers, solvents, co-emulsifiers and preservative systems for pharmaceutical and cosmetic products (89);
- WO2011055165: Topical Composition comprising Phosphates, Phosphonates, Phosphites and Phosphoramidates for topical application to hair and/ or skin (90).

Entretanto, a segurança destes compostos para utilização em cosméticos ainda não foi estudada. Este é o primeiro trabalho a fim de demonstrar o perfil

toxicológico das moléculas derivadas de xilitol (Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol).

1.2.4. Avaliação toxicológica de compostos e produtos cosméticos

Cosméticos são produtos amplamente utilizados desde as civilizações antigas. Além dos produtos de cuidado pessoal, tais como sabonetes e pasta dental, outros produtos de uso tópico têm se tornado muito populares devido ao interesse da sociedade moderna em manter a beleza e melhorar a aparência. Esta necessidade influencia diretamente o bem estar e a qualidade de vida das pessoas e cada vez mais produtos são lançados no mercado.

Antes de comercializar um produto cosmético, as empresas devem submetê-lo à ampla avaliação de segurança, contemplando testes a fim de proteger os consumidores de possíveis eventos adversos. Entretanto, mesmo após este procedimento, efeitos indesejados podem ocorrer (Figura 5) (91, 92).



Figura 5: Reações alérgicas a produtos cosméticos (Foto da autora)

Estudos epidemiológicos demonstram que as reações adversas a produtos cosméticos não são frequentes, mas quando ocorrem, normalmente são do tipo dermatite de contato irritativa ou alérgica (93).

A escolha das substâncias que minimizem ainda mais estes eventos é crucial para que a exposição dos usuários seja cada vez mais segura.

A avaliação de segurança baseia-se na caracterização do risco. Devem-se considerar os parâmetros toxicológicos dos componentes da formulação com

base em dados atualizados e também observar as condições de uso do produto e o público pelo qual será utilizado (94).

Segundo o Guia de Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), uma abordagem caso a caso deve ser realizada, considerando as informações disponíveis que contribuam para conhecimento do risco potencial nas condições normais e previsíveis de uso. A avaliação de segurança dos compostos de uma formulação deve seguir rigoroso delineamento científico para fornecer bases técnicas adequadas para a formulação de produtos seguros (95).

Para a avaliação da toxicidade de compostos devem-se considerar os seguintes parâmetros: toxicidade sistêmica aguda, corrosividade e irritação dérmica, sensibilização cutânea, absorção e penetração cutânea, doses repetidas, mutagenicidade e genotoxicidade, toxicidade subaguda e crônica, irritação ocular e de mucosas, efeitos tóxicos induzidos pela luz UV, carcinogenicidade, toxicidade do desenvolvimento e reprodução (teratogenicidade), toxicodinâmica e toxicocinética. Estes dados podem ser gerados através de avaliações *in silico*, *in vitro*, ensaios em animais e clínicos (95).

Entretanto, o banimento de testes toxicológicos em animais para compostos cosméticos, a partir de março de 2009, na Europa vem impactando o desenvolvimento de cosméticos de forma global. Experimentos em animais com produtos acabados já foram submetidos a banimento absoluto desde 11 de setembro de 2004, sendo que o prazo final de banimento não só para a realização mas também comercialização de produtos testados em animais foi dado em março de 2013 através da legislação europeia. Desta forma, testes alternativos ao uso de animais vêm sendo desenvolvidos a fim de auxiliar o grande desafio de realizar uma avaliação de segurança sem experimentos em animais (96).

Desde a década de 80, metodologias em substituição aos testes em animais com cosméticos vêm sendo desenvolvidas a fim de atender às necessidades de pesquisas farmacológicas e toxicológicas (97).

A comunidade científica vem se dedicando aos métodos alternativos baseados em sistemas computacionais e de testes *in vitro* (98). Adicionalmente, centros para validação e harmonização destes métodos vêm sendo promovidos em diversos locais do mundo. A Comunidade Europeia inaugurou o ECVAM (*Europe*

Committee for validation of Alternative Methods) em 1994. Nos Estados Unidos, o ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee on the Validation for Alternative Methods*) foi oficialmente criado em 2000 através do Ato de Autorização de 2000 (99). Este comitê é administrado pelo NICEATM (*National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*), o qual também conduz estudos independentes de validação para avaliar as aplicações e limitações de novos métodos e estratégias. Em 2005, o JaCVAM (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*) foi estabelecido como parte da Divisão de Farmacologia no Centro Nacional para a Segurança e Pesquisa Biológica, afiliado ao Instituto Nacional de Ciências da Saúde no Japão (100). Em 2009, representantes de 4 agências nacionais (ECVAM, NICEATM, JaCVAM e *Environmental Health Science and Research Bureau* do Canadá, *Health Canada*) assinaram um Memorando de Cooperação (MOC) estabelecendo a ICATM (Cooperação Internacional em Métodos Alternativos). Em seguida, em 2011, a República da Korea se tornou o quinto membro desta cooperação através do KoCVAM (*Republic of Korea's Center for the Validation of Alternative Methods*).

No Brasil, em 2008, através da Lei 11.794 (97), o uso de animais na experimentação científica e na educação foi regulamentado, criando-se o CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e a obrigatoriedade de Comissões de Ética no uso de animais (CEUAs) em instituições de pesquisa e ensino. Adicionalmente, uma parceria do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/ Fiocruz) com a ANVISA originou, em 2012, o BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos) como primeiro centro da América Latina para coordenar e validar estudos alternativos aos animais. Também em 2012, foi criada a RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos) para a execução dos ensaios para o processo de validação, aberta a laboratórios oficiais ou privados, universidades e empresas (101).

Todos esses centros estão trabalhando no intuito de validar testes toxicológicos *in vitro* para avaliação de produtos. A implementação destes ensaios no Brasil contribui para a garantia da saúde da população em conformidade com as regras de bioética e colabora para a pesquisa científica mundial.

Dentre os ensaios *in vitro*, a determinação da citotoxicidade e fototoxicidade são ensaios preliminares e a avaliação o potencial de irritação a

membrana mucosas através do método HET-CAM é complementar a estes ensaios (102).

O teste de Ames é uma metodologia rápida e de alta reprodutibilidade (103) e é o primeiro ensaio a ser escolhido para avaliação do risco de genotoxicidade de compostos que serão expostos aos humanos (104). A mutagenicidade é a capacidade de um composto causar alterações genéticas. Estes agentes podem interagir diretamente com o DNA (mutagênico primário) ou indiretamente, através de reações metabólicas (mutagênicos secundários) (105). Portanto, neste teste, acrescenta-se também uma fonte exógena de metabolização visando mimetizar de forma parcial o que ocorre em mamíferos (106). A substância é considerada mutagênica quando o número de colônias encontradas excede, no mínimo, 2 vezes o número de colônias dos controles negativos e uma relação dose-resposta pode ser observada. Conservantes, tais como fenoxietanol e ácido sórbico, apresentaram resultados negativos no teste de Ames (55,59).

A avaliação toxicológica tem o objetivo de assegurar não só a saúde humana, mas também a ambiental (107). Atualmente, há uma grande preocupação em relação ao potencial dos compostos químicos de agredir o ecossistema. A avaliação de ecotoxicidade é uma parte importante da avaliação de risco de substâncias que serão liberadas no ambiente e vários testes com microrganismos foram desenvolvidos (108). Há uma crescente preocupação com o entendimento da persistência de substâncias. O ensaio de biodegradabilidade imediata é utilizado para a triagem de substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas (PBT), sendo essencial para o início da avaliação dos efeitos a longo prazo de compostos para a saúde humana e ambiental (109). Devido à legislação e por motivos de ordem prática, vários testes de biodegradabilidade foram padronizados. Os testes de biodegradabilidade são baseados em parâmetros indiretos, tal como a remoção de carbono orgânico ou consumo de oxigênio. O ensaio de determinação de dióxido de carbono, conforme o guia da OECD 301B, é um dos mais utilizados para produtos cosméticos.

Embora a biodegradação sempre tenha sido um atributo importante para substâncias químicas, atualmente esta avaliação compõe a identificação do perigo de compostos ao ambiente. Além da importância para avaliação de segurança, a

indústria busca compostos biodegradáveis para utilizar em seus produtos não só por uma preocupação ambiental, mas também pelo interesse do consumidor.

Além dos ensaios *in vitro*, a toxicologia computacional tem contribuído para a avaliação de segurança através da combinação de ciência computacional, bioinformática, química e biologia molecular. É possível, portanto, estimar de maneira rápida e eficaz, os perigos ambientais e os riscos à saúde humana sem a necessidade de testes em animais. Órgãos internacionais, tais como a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA), Institutos Nacionais do Centro de Genômica (NCGC) e a FDA, vêm gerando dados *in vitro* de várias substâncias com o objetivo de auxiliar na toxicologia preditiva (110).

Embora haja exigência regulatória nos diferentes países no mundo para que compostos sejam avaliados em relação ao risco potencial para a saúde humana e para o meio-ambiente, a realização de testes é, muitas vezes, inviável, tanto do ponto de vista técnico quanto econômico. Desta maneira, nos últimos anos, esforços têm sido feitos para descrever e prever os efeitos biológicos e toxicológicos de compostos através de ferramentas

Como já relatado na literatura, a utilização de métodos rápidos para a escolha inicial de moléculas candidatas tem sido apontada como uma opção válida para otimização de recursos tanto técnicos quanto financeiros para a avaliação de segurança. A avaliação *in silico* deve ser o primeiro estágio de triagem para desenvolvimento de novas moléculas a fim de auxiliar no entendimento dos mecanismos toxicológicos (23).

Sistemas *in silico* podem ser utilizados para obter informações científicas ou mecanísticas ou podem ser utilizadas por motivos regulatórios. A escolha do melhor método computacional para avaliação de efeitos tóxicos depende dos parâmetros de interesse, tipo de dados a serem utilizados na análise (produtos naturais, orgânicos, inorgânicos e complexidade da estrutura) e tipo de respostas a serem obtidas. O ponto em comum destes métodos é a atribuição de efeito toxicológico a uma estrutura química. A identificação de toxicidade através de fragmentos moleculares é uma maneira prática de verificar, através de alertas estruturais, parâmetros como mutagenicidade, carcinogênese, irritação e toxicidade na reprodução, entre outros a fim de auxiliar de maneira rápida a triagem de moléculas para o mercado de produtos para cuidados da pele (107, 111-113).

A combinação de métodos *in vitro* e *in silico*, além de aplicável à área cosmética, vem ganhando maior espaço na avaliação dos parâmetros toxicológicos. Os dados obtidos são utilizados para a conclusão sobre os perigos dos compostos e a caracterização do risco, incluindo a avaliação sobre a exposição segura. Esta estratégia possibilita a melhor escolha e realização de ensaios clínicos, tanto para avaliar a segurança quanto eficácia de produtos.

Assim como as fragrâncias, é esperado que os conservantes elicitam reações adversas. Os parabenos são conhecidos por causar irritação. As propriedades irritantes de liberadores de formaldeído e de isotiazolinonas também já foram relatadas. Entretanto, estudos demonstraram que este potencial pode alterar conforme a formulação em que o composto está inserido, manifestando a irritação de forma objetiva através de sinais tais como eritema ou de forma subjetiva, como ardência (10). Por isso, estudos clínicos devem ser realizados para compor a avaliação de segurança, pois as manifestações cutâneas ocasionadas por conservantes de produtos podem ser identificadas clinicamente, como dermatites de contato irritativa ou alérgica, mas também podem ser de natureza subjetiva, tais como prurido e ardência (32).

Adicionalmente, os testes *in vitro* utilizados na avaliação toxicológica possuem limitações para a predição de efeitos relacionados à exposição humana aos compostos, havendo a necessidade de realização de testes clínicos a fim de confirmar se não haverá efeitos adversos durante a aplicação de um produto cosmético sobre a pele ou mucosas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil toxicológico das moléculas derivadas de xilitol, Ésteres de Fosfato de Xilitol (*Xylitol Phosphate Esters*) e Monoéster de C-8 xilitol (*C-8 Xylitol Monoester*) e sua multifuncionalidade em produtos cosméticos.

2.2. Objetivos específicos

◆ Realizar estudos pré-clínicos:

- Predição *in silico* para avaliação da segurança
- Citotoxicidade *in vitro*
- Fototoxicidade *in vitro*
- Potencial irritativo *in vitro*
- Potencial mutagênico *in vitro*
- Biodegradabilidade imediata *in vitro*

◆ Realizar estudos clínicos:

- Segurança
 - Compatibilidade cutânea
 - Potencial alergênico
 - Aceitabilidade cutânea e ocular
- Multifuncionalidade
 - Manutenção da hidratação
 - Atividade desodorante
 - Redução de oleosidade

3.1. Estudos pré-clínicos

3.1.1. Predição *in silico* para avaliação da segurança

3.1.1.1. Moléculas escolhidas para avaliação *in silico*

As moléculas derivadas de xilitol foram desenhadas através do software ACD/ ChemsSketch (disponível em: <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>) e obteve-se a notação química SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*).

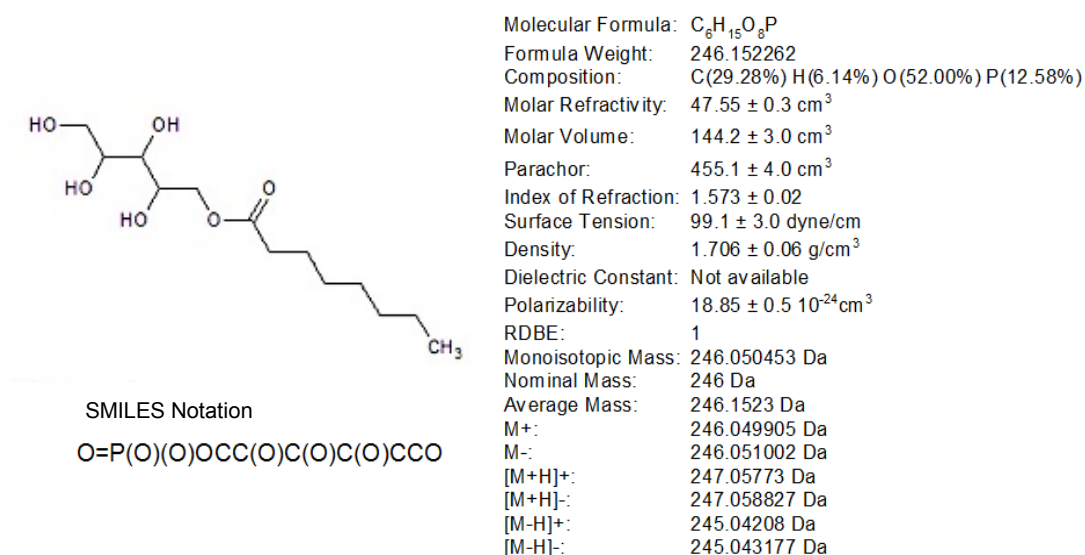
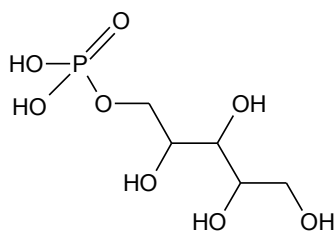


Figura 6: Notação SMILES do Monoéster de C-8 Xilitol

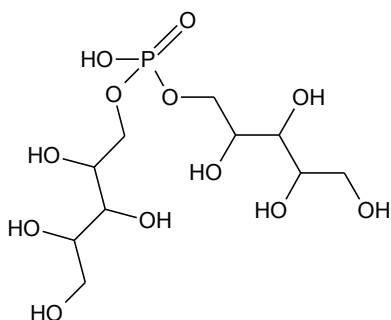


SMILES Notation

O=P(O)(O)OCC(O)C(O)C(O)CO

Molecular Formula	= C ₅ H ₁₃ O ₈ P
Formula Weight	= 232.125682
Composition	= C(25.87%) H(5.64%) O(55.14%) P(13.34%)
Molar Refractivity	= 42.91 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 127.7 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 415.3 ± 4.0 cm ³
Index of Refraction	= 1.586 ± 0.02
Surface Tension	= 111.8 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.817 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= Not available
Polarizability	= 17.01 ± 0.5 10 ²⁴ cm ³
Monoisotopic Mass	= 232.034803 Da
Nominal Mass	= 232 Da
Average Mass	= 232.1257 Da
M+	= 232.034255 Da
M-	= 232.035352 Da
[M+H] ⁺	= 233.04208 Da
[M+H] ⁻	= 233.043177 Da
[M-H] ⁺	= 231.02643 Da
[M-H] ⁻	= 231.027527 Da

Figura 7: Notação SMILES do Éster de Fosfato de (Mono) xilitol



SMILES Notation

OC(COP(O)(=O)OCC(O)C(O)C(O)CO)C(O)C(O)CO

Molecular Formula	= C ₁₀ H ₂₃ O ₁₂ P
Formula Weight	= 366.256182
Composition	= C(32.79%) H(6.33%) O(52.42%) P(8.46%)
Molar Refractivity	= 72.30 ± 0.3 cm ³
Molar Volume	= 210.2 ± 3.0 cm ³
Parachor	= 676.3 ± 4.0 cm ³
Index of Refraction	= 1.603 ± 0.02
Surface Tension	= 106.9 ± 3.0 dyne/cm
Density	= 1.741 ± 0.06 g/cm ³
Dielectric Constant	= Not available
Polarizability	= 28.66 ± 0.5 10 ²⁴ cm ³
Monoisotopic Mass	= 366.092712 Da
Nominal Mass	= 366 Da
Average Mass	= 366.2562 Da
M+	= 366.092164 Da
M-	= 366.093261 Da
[M+H] ⁺	= 367.099989 Da
[M+H] ⁻	= 367.101086 Da
[M-H] ⁺	= 365.084339 Da
[M-H] ⁻	= 365.085436 Da

Figura 8: Notação SMILES do Éster de Fosfato de (Di) xilitol

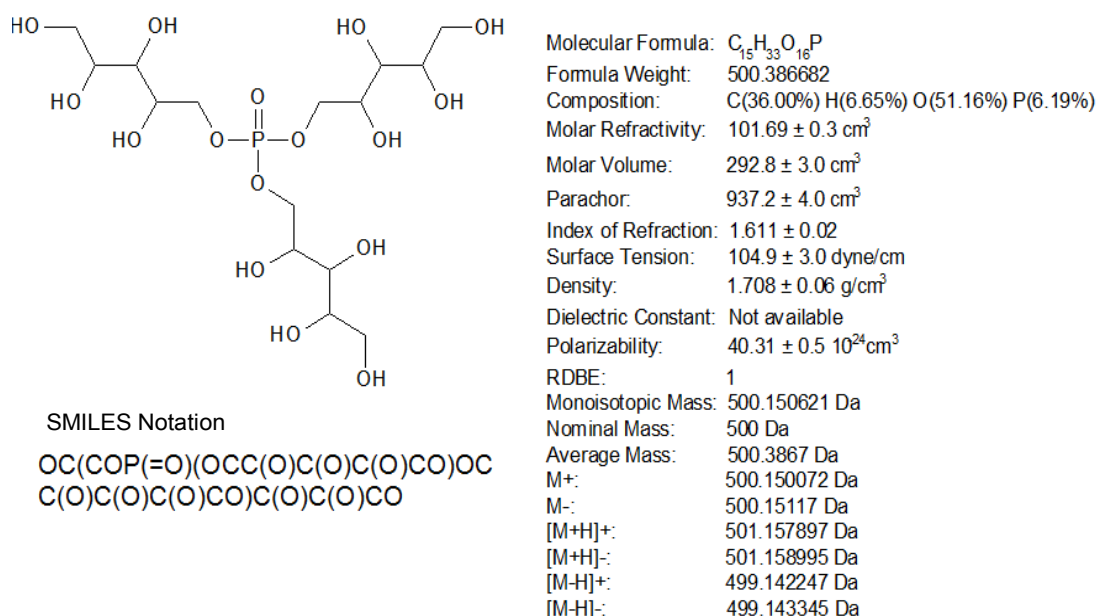


Figura 9: Notação SMILES do Éster de Fosfato de (Tri) xilitol

Também foi obtida a notação SMILES das seguintes moléculas com atividade conservante da tabela 4 para a avaliação *in silico* dos parâmetros relacionados à saúde humana.

Tabela 4: Notação SMILES dos compostos com atividade conservante

Nomenclatura INCI	Notação SMILES
DMDM Hydantoin	<chem>CC1(C(=O)N(C(=O)N1CO)CO)C</chem>
Iodopropynyl Butylcarbamate	<chem>N(C(=O)(OCC#CI))CCCC</chem>
Benzoic Acid	<chem>c1(ccccc1)C(=O)O</chem>
Benzyl Alcohol	<chem>c1(ccccc1)CO</chem>
Butylparaben	<chem>c1(ccc(cc1)O)C(=O)OCCCC</chem>
Caprylyl Glycol	<chem>C(C(CO)O)CCCCC</chem>
Dehydroacetic acid	<chem>O=C1(C(=C(C=C(O1)C)O)C(=O)C)</chem>
Ethylhexylglycerin	<chem>OC(COCC(CCCC)CC)CO</chem>
Ethylparaben	<chem>c1(C(=O)(OCC))ccc(O)cc1</chem>

Formaldehyde	<chem>O=C</chem>
Imidazolidinyl urea	<chem>O=C(NCNC(=O)NC(NC(=O)N1CO)C1(=O))NC(NC(=O)N2CO)C2(=O)</chem>
Methylisothiazolinone	<chem>O=C1(N(SC=C1)C)</chem>
Methylparaben	<chem>c1(ccc(cc1)O)C(=O)OC</chem>
Phenoxyethanol	<chem>c1(ccccc1)OCCO</chem>
Phenylethyl alcohol	<chem>c1(ccccc1)CCO</chem>
Propylparaben	<chem>c1c(O)ccc(C(=O)(OCCC))c1</chem>
Quaternium-15	<chem>CLC=CCN(CL)(CN(C1)C2)(CN1C3)CN32</chem>
Sorbic acid	<chem>C(=CC=CC)C(=O)(O)</chem>
Triclosan	<chem>c1(Oc2c(cc(CL)cc2)CL)c(cc(CL)cc1)O</chem>
Xylitol	<chem>OCC(O)C(O)C(O)CO</chem>

3.1.1.2. Avaliação *in silico* dos parâmetros relacionados à saúde humana

Foi utilizada a metodologia QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) através das ferramentas computacionais TOXtree versão 2.1.0 e OECD QSAR Toolbox versão 1.1.

Esta ferramenta está disponível no site do ECVAM – Centro Europeu de Validação de Métodos alternativos (https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratoriesresearch/predictive_toxicology/qsar_tools/toxtre).

Os parâmetros escolhidos foram:

- propriedades físico-químicas, incluindo LogKoW;
- *Cramer rules*;
- TTC (*Threshold of Toxicological Concern*);
- Reação de Michael;
- carcinogenicidade/ mutagenicidade;
- irritação/ corrosividade cutânea e ocular;
- sensibilização.

Para a análise dos compostos, a notação SMILES foi inserida na ferramenta (Figura 10).

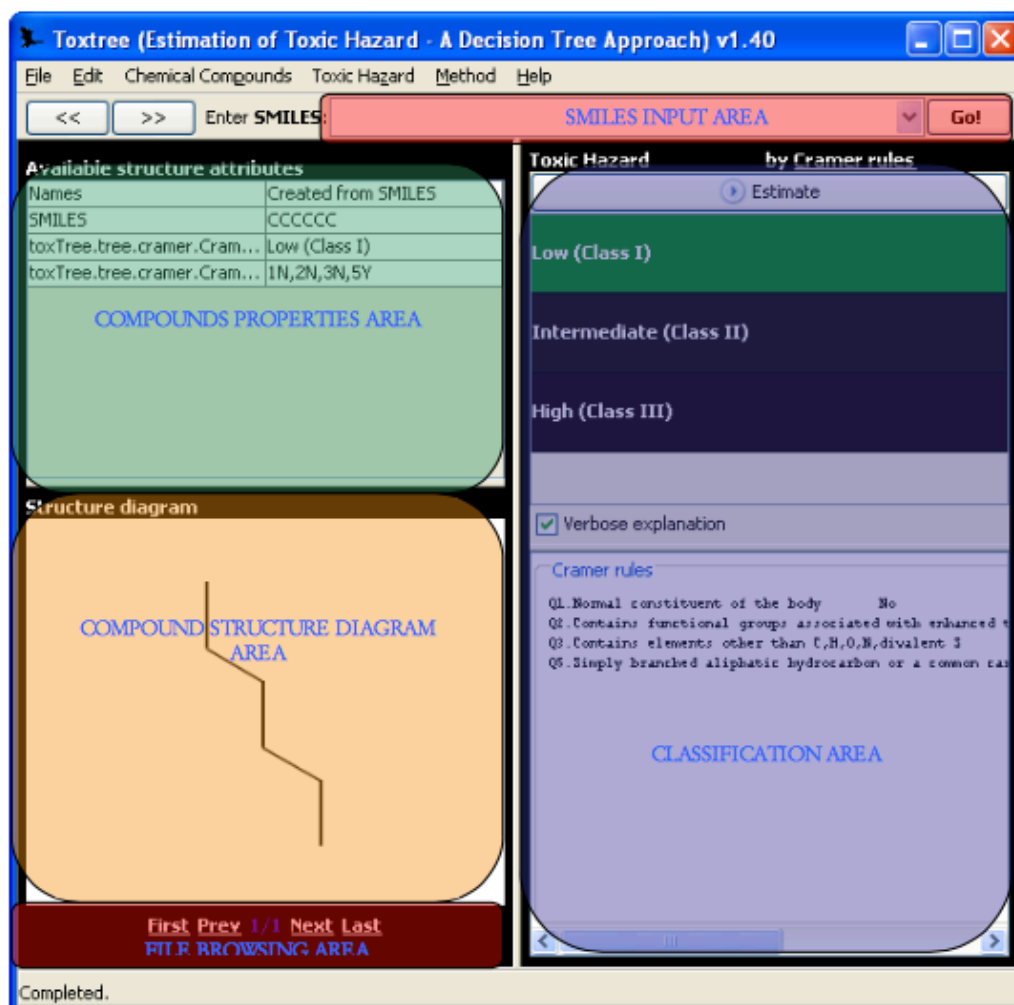


Figura 10: Janela Principal da Ferramenta ToxTree

Os resultados obtidos (Figura 11) relacionados à sensibilização, irritação cutânea e ocular, mutagenicidade/ carcinogenicidade, regras de Cramer e LogKow (o que auxilia na avaliação do potencial de permeação) para as moléculas derivadas de xilitol e para as moléculas com propriedades conservantes foram tabulados e submetidos a análise estatística para comparação dos perfis toxicológicos.

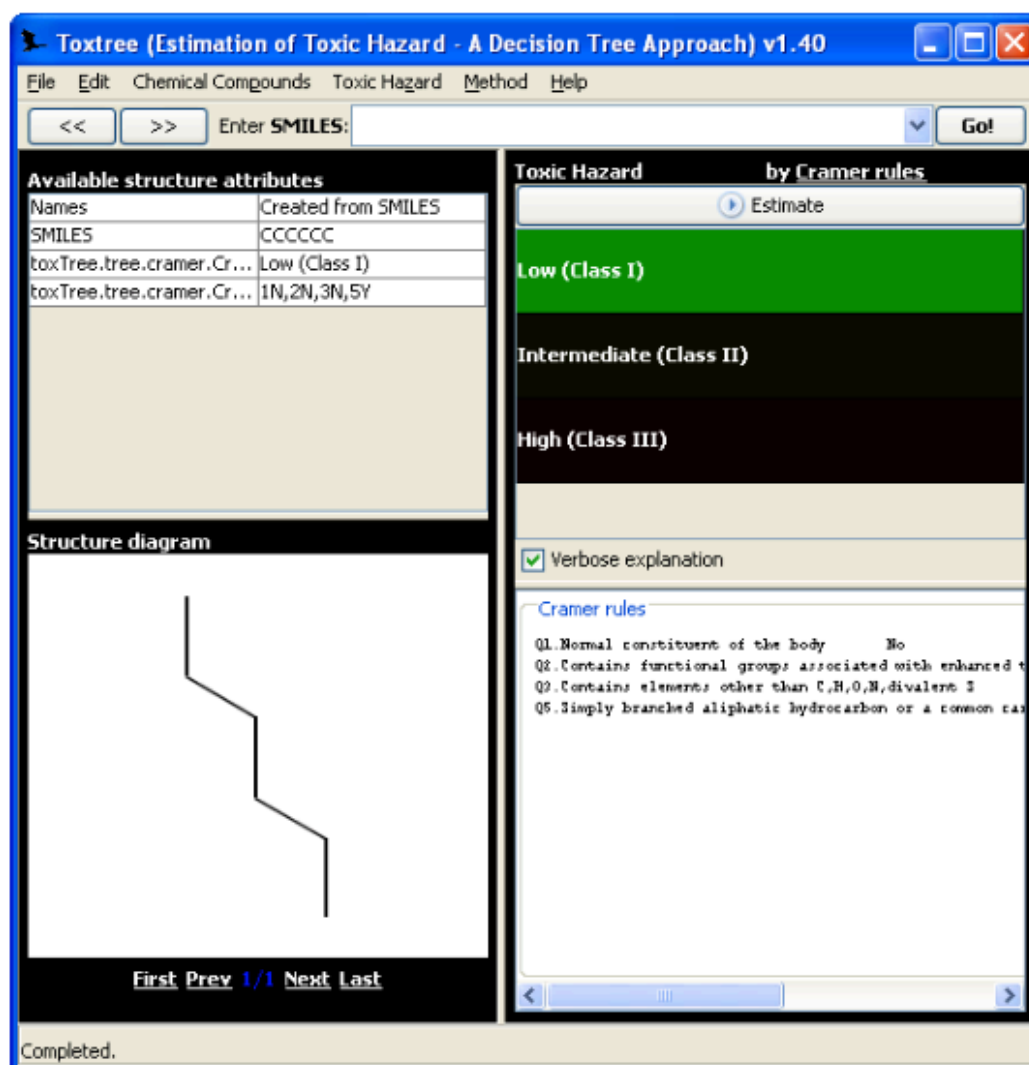


Figura 11: Visualização do Resultado da Ferramenta ToxTree

3.1.1.3. Avaliação *in silico* da biodegradabilidade imediata

Para a avaliação da biodegradabilidade imediata, parâmetro relacionado à saúde ambiental, foi utilizada metodologia de QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) através do software SARpy da plataforma Vega versão 1.0.8, do programa START do software TOXTREE versão 2.6.6 e o programa Biowin versão 4.10 (EPISuite versão 3.20 do software OECD QSAR Toolbox versão 1.1). A predição foi gerada através da estrutura química.

O resultado do programa BIOWIN é dado de forma qualitativa "sim" ou "não" (prontamente biodegradável/ não prontamente biodegradável).

No programa START, os compostos podem ser classificados como Classe 1 – Composto facilmente biodegradável, Classe 2 – Composto persistente e Classe 3 – Biodegradabilidade desconhecida.

A plataforma VEGA está disponível online (web-site: <http://www.vega-qsar.eu/index.php>). A molécula avaliada pode ser classificada como prontamente ou não prontamente biodegradável, possivelmente prontamente biodegradável, não avaliada). Neste modelo, há dados adicionais para indicação da confiabilidade da predição.

3.1.1.4. Análise estatística da avaliação *in silico*

A análise estatística foi realizada com o programa SAS (*Statistical Analysis Systems*) para os parâmetros relacionados à saúde humana.

Com o intuito de verificar a existência de diferenças entre os grupos, o Teste Exato de Fisher foi aplicado para as variáveis Sensibilização, Irritação e Mutagenicidade/ Carcinogenicidade, o Teste de Mann-Whitney U para a variável *Cramer rules* e o Teste T da diferença das médias para variável LogKow.

Para o parâmetro relacionado à saúde ambiental, os dados foram apresentados de maneira descritiva.

3.1.2. Moléculas derivadas de xilitol para estudos *in vitro*

As moléculas derivadas de xilitol (Monoéster de C-8 Xilitol e Ésteres de Fosfato de Xilitol) foram produzidas e fornecidas pelo Instituto de Química da UNICAMP em parceria com a empresa Chemyunion Química Ltda (Sorocaba-SP, Brasil), sendo que os Ésteres de Fosfato de Xilitol estão distribuídos conforme Tabela 5.

Tabela 5: Distribuição dos Ésteres de Fosfato de Xilitol

Composto	%
Xilitol	33,4
Monoéster condensado	24,3
Monoéster	-
Diéster condensado	3,90
Diéster	21,6
Triéster	16,8

3.1.3. Citotoxicidade *in vitro*

O teste de viabilidade/ citotoxicidade celular foi realizado no laboratório de CFU (*Colony Forming Unit*) na UNICAMP – Campinas, SP.

3.1.3.1. Cultura de células

A utilização de linhagem de células humanas para realização destes estudos foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob parecer nº 582/2006 e CAAE 0460.0.146.000-06 (Anexo 2).

3.1.3.2. Linhagem de fibroblastos humanos

Fibroblastos humanos criopreservados de origem dérmica (Clonetics™ NHDF - *Normal Human Dermal Fibroblasts*, CC-2511) foram adquiridos da Cambrex/Lonza (*Walkersville-MD*). Os fibroblastos foram cultivados e expandidos em garrafas de 25cm² (*Corning Inc, New York, NY*) até, pelo menos, a quinta passagem, em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura específico, contendo 500mL de meio de cultura basal para fibroblastos (FBM – *Fibroblast Basal Medium*, CC-3131) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS – *Fetal Bovine Serum*, CC-4101J), 5 µg/mL de insulina bovina (*Insulin Bovine*,

CC-4021J), 10 ng/mL de fator de crescimento de fibroblastos humanos (rhFGF-B – *r-Human Fibroblast Growth Factor-B*, CC 4065-J) e uma associação de antibióticos contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (*Penicillin-Streptomycin*, 15070063, Invitrogen).

O meio de cultura foi substituído duas vezes por semana e ao atingirem aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (Trypsin-EDTA, Gibco/Invitrogen, Cat. 25200-072), neutralizadas com o próprio meio de cultura, centrifugadas 220g por 10 minutos e semeadas em placas de 24 poços (Nunc, Roskilde, DM) na densidade de 1×10^5 células/poço para posterior incubação com os compostos.

3.1.3.3. Ensaio de Viabilidade celular/ Efeito citotóxico

A viabilidade celular foi determinada por um método colorimétrico que utiliza o corante MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium) (*Sigma Chemical, St. Louis, Mo.*) (114; 115). Esse ensaio é baseado na conversão do brometo de tetrazolium amarelo (MTT) para formazan azul pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial nas células viáveis. Fibroblastos foram semeados na densidade de 1×10^4 células/poço em placas de 96 poços (*Nunc, Roskilde, DM*). Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol foram dissolvidos em meio de cultura específico para fibroblastos e adicionados à placa de 96 poços em uma diluição seriada na faixa de 0,0001 a 50,0 mg/mL. A cultura foi incubada por um período de 48 horas. O MTT foi então adicionado na cultura na concentração de 5mg/mL (30µL/poço) e incubado por mais 4 horas. O conteúdo do poço foi removido e 100 µl de etanol foi adicionado com o propósito de solubilizar os cristais de formazan formados. A absorbância de cada poço foi determinada a 570nm em um leitor de Elisa (*Multiscan MS, Labsystems, Helsinki, Finland*) (Figura 12). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem e calculada conforme a equação 1:

$$\text{células viáveis} = \frac{\text{absorbância da amostra incubada com substância teste}}{\text{absorbância do controle}} \times 100$$

Equação 1: Cálculo de células viáveis no ensaio de citotoxicidade

Foi determinado o valor de IC_{50} , ou seja, a concentração de substância testada que diminui em 50% a viabilidade da cultura de células (115).

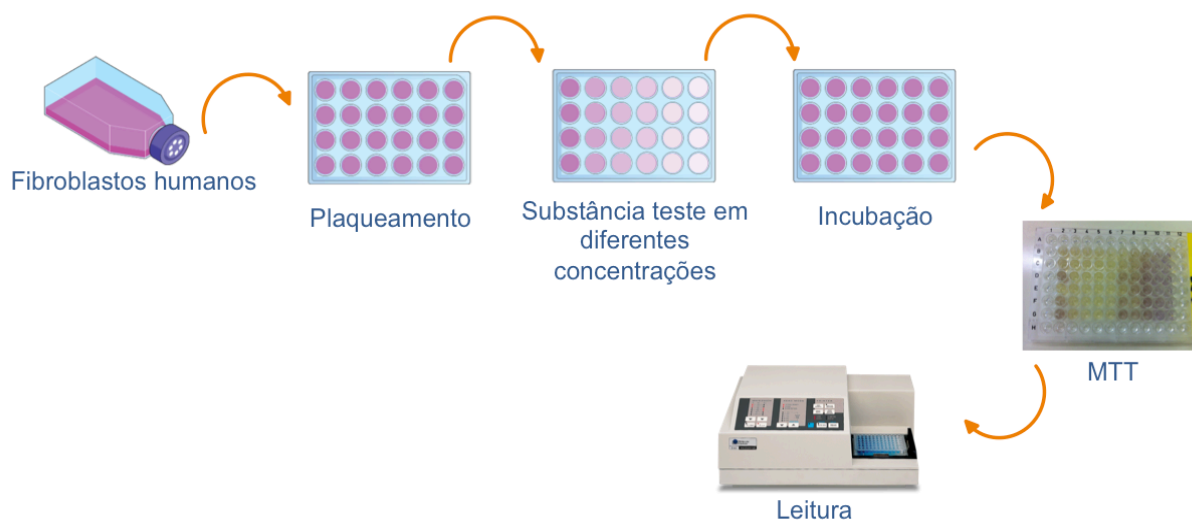


Figura 12: Ensaio de citotoxicidade

3.1.4. Fototoxicidade *in vitro*

O ensaio de fototoxicidade foi realizado no laboratório da empresa Chemyunion Ltda – Sorocaba, SP.

3.1.4.1. Linhagem de fibroblastos murinos

Fibroblastos murinos (3T3) (ATCC®CCL-92™; *American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA*), não ultrapassando 3ª a 5ª passagem, foram semeados e cultivados, em estufa úmida a 37°C em presença de 5% de CO₂, utilizando meio de cultura específico *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM; Sigma–Aldrich, Saint Louis, MO, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 0,001% de Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e uma associação de antibióticos contendo 0,10% de gentamicina e 0,80% de anfotericina (*B Amphotericin, Sigma–Aldrich*).

O monitoramento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas, de forma que, ao atingirem aproximadamente 80-90% de confluência, as células foram tripsinizadas (tripsina 0,25%) durante 1 minuto e semeadas na densidade de 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços para posterior incubação com as moléculas derivadas de xilitol e avaliação do potencial fototóxico.

3.1.4.2. Ensaio de fototoxicidade

As condições experimentais adotadas nas avaliações de fototoxicidade, envolvendo a utilização de células em condições ótimas de cultivo, também condizem com as metodologias atuais aplicadas, aceitas e validadas pela comunidade científica internacional (116 - 119).

A cultura celular foi preparada, utilizando-se 2 placas de 96 poços. Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol foram dissolvidos em EBSS (GIBCO® *Earle's Balanced Salt Solution*), adicionados às placas nas concentrações de 0,0001% a 10,00% ou 50,00mg/mL e mantidos em contato por um período de 60 minutos (a 37°C, 5% CO₂).

Antes do experimento, foi verificada a confluência e aparências das células em microscópio invertido, removendo cuidadosamente todo meio de cultura (200µL) de cada poço das duas placas de 96 poços contendo as células em proliferação. Os poços foram lavados duas vezes com EBSS e em seguida adicionou-se 200µL de EBSS nos poços B2, C2, D2, E11, F11 e G11 para obter o controle positivo (+) do teste. Foram adicionados 200 mL de cada concentração, em 3 poços (triplicata), iniciando no poço E2, sempre no sentido vertical.

Uma das placas foi exposta à radiação UVA ($5\text{J}/\text{cm}^2$) (SOL-500, Honle) enquanto a outra placa foi mantida no escuro. Após a irradiação, o EBSS foi removido das duas placas e as mesmas foram lavadas duas vezes com EBSS, adicionando-se 200µL de meio de cultura nas placas para incubação a 37°C, 5% CO₂ por mais 24 horas (*overnight*) e após este período a viabilidade celular foi mensurada pelo método Vermelho Neutro utilizando o NR (*Neutral Red*) Kit (*In Cytotox KRCV 96.300, Xenometrix AG*). Foram observados a morfologia e o crescimento das células em microscópio invertido, removendo cuidadosamente o meio de cultura dos poços contendo células. As placas foram lavadas 2 vezes com

300mL/poço da solução de lavagem NR I.

Após o preparo da solução de Vermelho Neutro NR II na diluição de 1:100 em meio de cultura, foram adicionados 200µL desta solução em cada poço e as placas foram novamente incubadas por 2-4 horas a 37°C e 5% CO₂. Finalizado o tempo de incubação, a solução NR II foi cuidadosamente removida por aspiração, para não remover a camada de células.

Na etapa final, foram adicionados 200µL da solução de fixação NR III em cada poço, que permaneceu em contato com as células por 1 minuto. Esta solução foi removida por aspiração, para a adição de 200mL da solução de solubilização NR IV em cada poço. As placas foram incubadas por mais 15 minutos em temperatura ambiente. Finalizado o tempo de incubação, as mesmas foram agitadas para a completa homogeneização da solução. As bolhas foram removidas e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540nm, conforme figura 13.

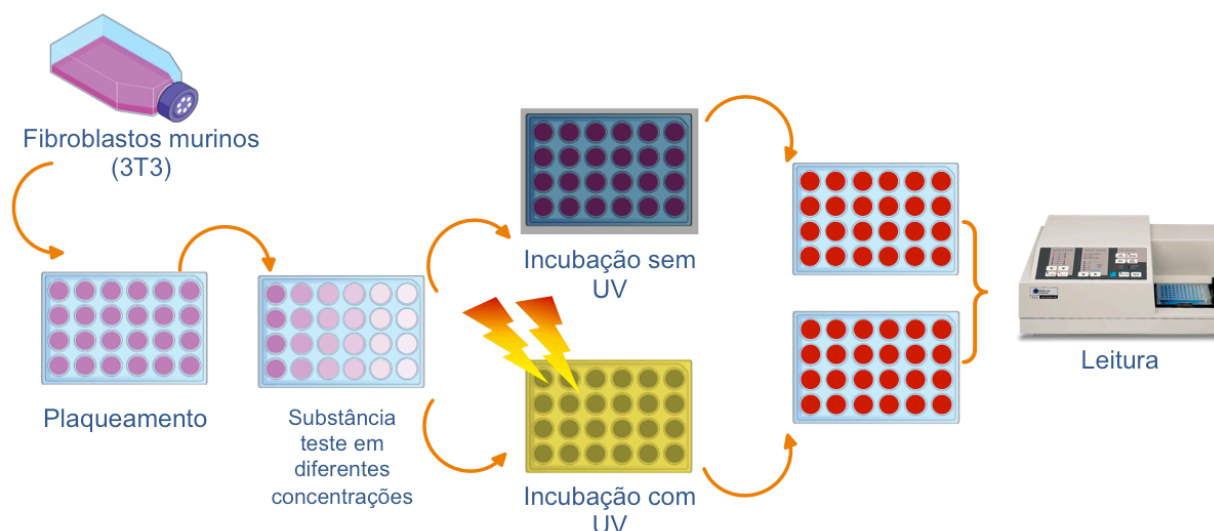


Figura 13: Ensaio de fototoxicidade

Os parâmetros de avaliação de fototoxicidade levaram em consideração a porcentagem de morte celular, a IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade) e o PIF (fator de foto-irritação) (Equação 2 e Tabela 6).

A porcentagem de morte celular foi calculada para cada concentração, conforme Equação 2:

$$\% \text{ células mortas} = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle}} \times 100$$

Equação 2: Cálculo de morte celular - Fototoxicidade

A média dos valores de densidade óptica (OD) foi calculada para cada grupo. Os valores de OD obtidos no controle negativo correspondem à viabilidade celular de 100%. O Fator de Fotoirritação (PIF) foi determinado de acordo com a Equação 3:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ do produto teste em condição escuro}}{\text{IC}_{50} \text{ do produto teste submetido a UVA}}$$

Equação 3: Cálculo do Fator de Fotoirritação

O potencial fototóxico do produto teste foi classificado de acordo com a tabela 6.

Tabela 6: Classificação da Fototoxicidade em função do PIF

PIF	Classificação
< 2	Não fototóxico
2 < PIF < 5	Possivelmente fototóxico
> 5	Fototóxico

3.1.5. Potencial irritativo *in vitro*

3.1.5.1. Avaliação da irritação ocular - HET-CAM (Teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha)

A técnica utilizada foi uma adaptação daquela descrita por Luepke e Kemper em conjunto com a metodologia descrita pelo ECVAM (98, 102, 120).

Conforme Anexo 1, este estudo obteve parecer favorável do comitê de ética em animais, estando de acordo os princípios éticos na experimentação animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente.

Ovos brancos de galinhas *Leghorn*, classificados entre 40 a 75g foram fornecidos pela Granja Dr. Nakano (ovos para pesquisa científica e produtos biológicos), Sorocaba, São Paulo, Brasil.

No recebimento, os ovos passaram pelo procedimento de conferência de integridade e controle de peso para posterior incubação. Os ovos foram posicionados em incubadora com rolagem automática com controle de temperatura ($37,8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Os ovos foram incubados por um período de 9 a 10 dias.

3.1.5.1.1. Preparação do produto teste

Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol foram avaliados tal e qual, puros, sendo mantidos em banho-maria para atingir 37°C antes do início do procedimento.

3.1.5.1.2. Preparação dos ovos

Todo o experimento foi conduzido embaixo de uma luminária. No 10º dia de incubação, os ovos foram retirados da incubadora e verificados quanto à sua integridade.

Os ovos defeituosos (imagem que não corresponde à fase de desenvolvimento esperados) foram eliminados e os ovos selecionados foram submetidos ao teste, com "bolsa de ar" (célula aérea) para cima.

3.1.5.1.3. Determinação do potencial irritante

O teste foi realizado conforme figura 14.

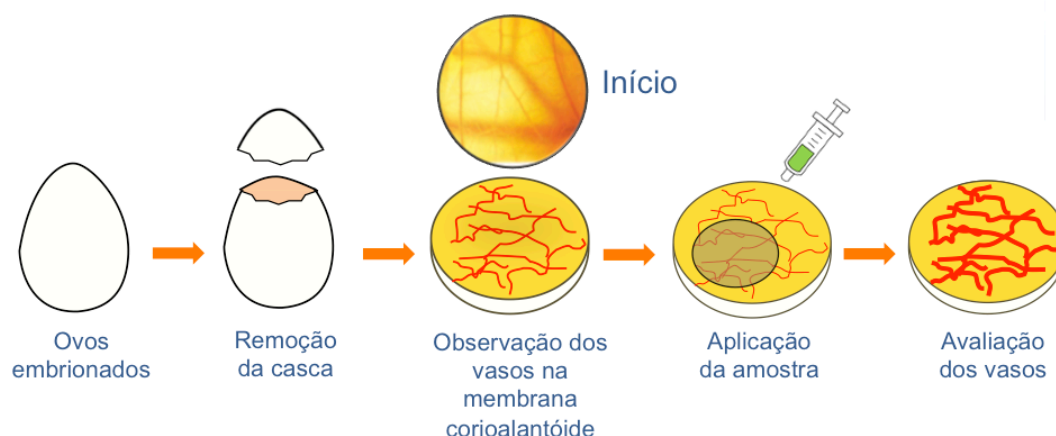


Figura 14: Avaliação da irritação através do HET-CAM (121)

A casca de cada ovo selecionado foi perfurada (com uma agulha lanceolada), aberta e cortada (com tesoura ou alicate) da bolsa de ar até os limites da membrana.

Em seguida, toda a superfície da membrana foi umedecida com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% e aquecida a 37°C (banho-maria). Então, o ovo foi inclinado para eliminar o excesso de solução de cloreto de sódio a 0,9% e a membrana da casca foi removida delicadamente com uma pinça a fim de descobrir a membrana corioalantóide (CAM). Os ovos que tiveram a membrana corioalantóide danificada foram rejeitados.

Foram utilizados 4 ovos para cada teste realizado, adicionando-se 0,3g de um dos compostos derivados de xilitol, em experimentos separados, diretamente na CAM. Imediatamente após aplicação, o cronômetro foi acionado para a observação dos fenômenos desencadeados.

Após 20 segundos de contato, a CAM foi lavada com 10mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (mantida a 37°C em banho-maria), com o auxílio de uma seringa, evitando qualquer projeção brutal. Esta solução foi removida com a inclinação dos ovos.

Os fenômenos desencadeados, indicativos de irritação, foram observados durante 5 minutos. O tempo exato de cada fenômeno observado foi registrado. Os 20 segundos de contato foram incluídos nos 5 minutos de observação. No final do estudo, os embriões foram descartados por resfriamento. Os fenômenos observados (Figura 15) foram avaliados visualmente de acordo com presença ou ausência e sua

intensidade, seguindo a Tabela 7.



Figura 15: Fenômenos observados no HET-CAM (10)

Tabela 7: Pontuação dos fenômenos observados em função do tempo

Fenômenos	Pontuação em função do tempo	
Hiperemia Aumento do fluxo sanguíneo	$T \leq 30s$	5
	$30s < T \leq 2min$	3
	$2min < T \leq 5min$	1
Hemorragia Extravasamento de sangue nos vasos	$T \leq 30s$	7
	$30s < T \leq 2min$	5
	$2min < T \leq 5min$	3
Coagulação Presença de coágulo	$T \leq 30s$	9
	$30s < T \leq 2min$	7
	$2min < T \leq 5min$	5

Cada fenômeno visualizado só foi contado uma vez, quando ocorreu. A pontuação para cada ovo foi obtida a partir da soma das notas de hiperemia, hemorragia e coagulação. A classificação dos compostos derivados de xilitol foi baseada na pontuação média obtida na avaliação dos 4 ovos, conforme Tabela 8.

Tabela 8: Classificação do potencial irritante de acordo com a pontuação atingida (P)

Pontuação média	Classificação
$P < 1$	Praticamente não irritante
$1 \leq P < 5$	Fracamente irritante
$5 \leq P < 9$	Moderadamente irritante
$P \geq 9$	Irritante

O ensaio teve como controle negativo a solução de cloreto de sódio a 0,9% e como controle positivo a solução padrão de *sodium dodecyl sulphate, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfate* (Sigma D4516) em água. O controle positivo encontra-se validado, quando:

- A concentração 0,05% pontua de 0,5 a 5,0.
- A concentração 0,4% pontua de 10,5 a 12,5.
- A concentração 3,2% pontua de 17,0 a 21,0.

3.1.5.2. Avaliação da irritação ocular - BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability Test*)

O teste de opacidade e permeabilidade da córnea bovina foi realizado de forma complementar ao HET-CAM para o Monoéster de C-8 Xilitol.

Foi utilizada a metodologia OECD 437 (*Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants*) (122).

Este ensaio consiste na aplicação da substância teste (Monoéster de C-8 Xilitol a 10%) em córneas bovinas a fim de verificar o potencial irritativo e corrosivo. As córneas foram extraídas do globo ocular de bovinos provenientes de frigorífico e colocadas em um suporte.

Primeiro, é adicionada a substância teste na superfície epitelial da córnea e após incubação, é realizada a medida de opacidade com um opacitômetro de forma quantitativa pela transmissão de luz.

Em seguida, fluoresceína de sódio (solução 0,01mg/mL) é adicionada a fim de medir quantitativamente a permeabilidade pela passagem do corante com espectrofotômetro de luz visível (absorbância a 490nm).

É calculada, então, a pontuação de irritação, conforme equação 4.

Pontuação de irritação = média do valor de opacidade + (15 x média do valor da permeabilidade)

Equação 4: Cálculo da pontuação de irritação do teste de BCOP

Como controle positivo foi utilizado o etanol e como controle negativo

solução de *Hanks*.

A classificação dos compostos foi feita conforme tabela 9:

Tabela 9: Escala de irritação para o teste de BCOP

Pontuação de irritação	Classificação
0-3	Não irritante
3,1-25	Levemente irritante
25,1-55	Moderadamente irritante
55,1-80	Irritante forte
>80,1	Severamente irritante

3.1.6. Potencial mutagênico *in vitro*

3.1.6.1. Linhagens utilizadas

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100, TA1535 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (Tabela 10).

Tabela 10: Cepas utilizadas no estudo e tipo de mutação detectada

Cepa	Tipo de mutação
<i>S. typhimurium</i> TA100 pKM101	Substituição de par de base
<i>S. typhimurium</i> TA98 pKM101	Deslocamento do quadro de leitura
<i>S. typhimurium</i> TA97a pKM101	Deslocamento do quadro de leitura
<i>S. typhimurium</i> TA102 pKM101 pAQ1	Substituição de par de base
<i>S. typhimurium</i> TA1535	Substituição de par de base

As cepas foram cultivadas por $10 \pm 0,5$ horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em 30mL de caldo nutriente contendo ampicilina para todas as cepas, com exceção da TA1535, e tetraciclina apenas para a TA102 e mantidas em banho com agitação.

As culturas foram utilizadas dentro de 2h após o final do período de incubação.

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram verificadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. Parâmetros como dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB*, presença de plasmídios de resistência e taxa de reversão espontânea foram determinados de acordo com Maron e Ames (123, 124).

3.1.6.2. Preparo do sistema de ativação metabólica S9

Foi utilizada a fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Arocloror 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Esta fração foi obtida da empresa MOLTOX (*Molecular Toxicology Inc., USA*). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4 M e cloreto de potássio 0,4 M, glicose-6-fosfato 1 M, β -nicotinamida adenina dinucleotidifosfato 0,1 M, tampão fosfato 0,2 M pH = 7,4 e água destilada), inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante todo o ensaio, preparadas e utilizadas por um período de, no máximo, 3 horas.

3.1.6.3. Controles do teste de Ames

O controle negativo foi feito com água destilada (10 μ L/placa). O ensaio foi realizado incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controles positivos *4-Nitroquinoline-1-oxide* (4NQO) – solução preparada com DMSO, Sodium Azide (NaN₃) – solução preparada com água destilada e *Aflatoxin-B1* (AFB₁) – solução preparada com DMSO (Tabela 11). Todos os controles foram adquiridos da empresa Sigma Co.

Tabela 11: Substâncias utilizadas como controle positivo no teste de Ames

Substância	Concentração (µg/mL)	Concentração final (µg/placa)	Uso	
			Cepas	S9
4NQO	10	0,5	TA98, TA97a, TA102	-
NaN ₃	100	1,0	TA100, TA1535	-
AFB ₁	100	1,0	TA100, TA98, TA97a, TA102, TA1535	+

3.1.6.4. Ensaio de mutagenicidade

A concentração adequada das substâncias teste foram determinadas, onde a variação de concentração deve ser a maior permitida de acordo com a toxicidade e solubilidade do composto ou até a concentração máxima de $5000 \pm 0,01$ µg/placa para substâncias sólidas (105, 106, 125).

As concentrações utilizadas foram 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000µg/placa para Ésteres de Fosfato de Xilitol e 200, 400, 600, 800 e 1000µg/placa para Monoéster de C-8 Xilitol com presença e ausência de metabolização.

A solução de substância teste ou dos controles (10µL, com exceção de 4NQO, para o qual foi utilizado 5µL) foram adicionados a 100µL de cultura de bactérias e 500µL de tampão fosfato pH 7,4 (ou 0,5mL da mistura S9 em ensaios com ativação metabólica) e incubadas por 20 minutos a 37°C. Após este período, adicionaram-se 2,0mL de ágar superfície (“top agar”) suplementado com traços de histidina e biotina, homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do ágar, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Após esse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa (Figura 16). O ensaio foi realizado em triplicata.

O índice mutagênico (MI) foi calculado como a média de cada concentração dividida pela média do controle negativo.

A substância teste é considerada mutagênica se o teste estatístico resulta em resposta significativa (valor de p para teste de ANOVA $\leq 0,05$), se os dados apresentam correlação significativa com a dose (valor de p para inclinação na

origem $\leq 0,01$) e se o aumento da média de revertentes nas placas testes são, no mínimo, 2 vezes maiores do que a observada nas placas do controle negativo ($MI \geq 2,0$) para todas as cepas, com exceção da TA1535 (aumento deve ser maior ou igual a 3), conforme classificação da tabela 12.

Tabela 12: Classificação da Mutagenicidade de acordo com MI

MI	Classificação
< 0,5	Pode haver indução de revertentes
1,0	Não há indução de revertentes
≥ 2	Mutagênico
≥ 3 para TA 1535	

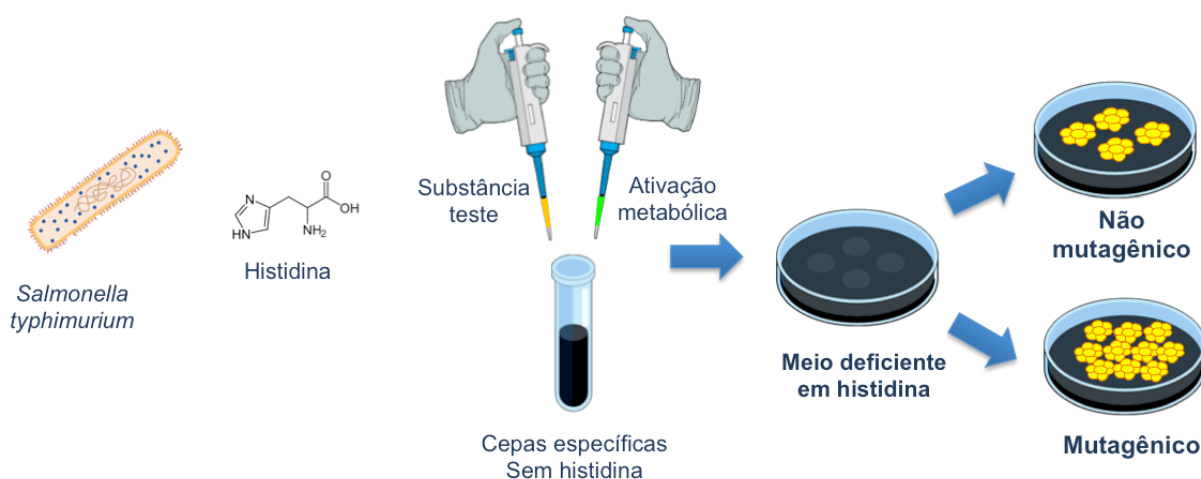


Figura 16: Esquema do teste de Ames

3.1.7. Biodegradabilidade imediata *in vitro*

O método utilizado para avaliação da biodegradabilidade imediata foi *Ready Biodegradability: 301 B CO Evolution Test adopted on 1992* (126).

Foram utilizados os seguintes tratamentos, os quais receberam 10mg de inóculo/ litro de meio, 24h antes da adição da substância teste:

- Branco: solução mineral (em duplicata)

- Solução padrão para biodegradabilidade: benzoato de sódio 20mg de carbono/ litro.
- Substância teste: concentração de 10mg de carbono/litro (em duplicata)
- Inibição: benzoato de sódio (20mg de carbono/ litro) e substância teste (10mg de carbono/ litro).

Uma mistura de microrganismos do esgoto, em alta concentração de material orgânico, foi coletada na estação de esgoto doméstico de Piracicaba. Dois litros do material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado foi ressuspenso em solução nutriente para obtenção do inóculo. O número de microrganismos foi determinado pela diluição em placas pelo método de plaqueamento em profundidade. O número de células viáveis foi de $2,59 \times 10^6$ UFC/mL.

A quantidade total de carbono das moléculas derivadas de xilitol foi determinada pela análise da combustão ($56,64 \pm 12,63\%$).

Os compostos derivados de xilitol (0,05g) foram transferidos para frascos com 3 litros de solução nutriente com o precipitado.

Os frascos dos tratamentos foram acoplados a um sistema de aeração de fluxo contínuo com frascos de hidróxido de sódio em série e a outros frascos com 100mL de hidróxido de bário para a captura do carbono liberado.

O teste foi conduzido com ausência de luz, a temperatura de 10-15°C durante 15 dias para os Ésteres de Fosfato de Xilitol e 28 dias para o Monoéster de C-8 Xilitol.

A biodegradabilidade foi analisada pela evolução do CO₂ absorvido pela solução de hidróxido de bário, o qual foi determinado por titulação com HCl.

3.1.8. Análise estatística dos estudos *in vitro*

Para o teste de AMES, análise estatística de *Salmonella* (Environmental Monitoring System Laboratory, EPA - Software Version 2.3, April 1988) e análise de variância (ANOVA) foram realizadas. Considerou-se 90% de intervalo de confiança. Para Citotoxicidade e Fototoxicidade, os resultados foram expressos de maneira descritiva (média e desvio padrão). No teste HET-CAM e no teste de BCOP, os

dados foram expressos como pontuação de irritação. Para o teste de biodegradabilidade, os dados foram expressos em porcentagem de gás carbônico liberado.

3.2. Estudos clínicos

Os estudos clínicos apresentados neste trabalho foram realizados em parceria com a empresa de testes de segurança e eficácia Evic Brasil – Instituto de Bioengenharia da Pele – São Paulo, SP.

Conforme tabela 13, os testes clínicos foram realizados a fim de prosseguir com a avaliação de segurança das moléculas derivadas de xilitol em concentrações onde o efeito conservante foi demonstrado. Também foram realizados alguns estudos a fim de verificar a eficácia potencial dos ativos para o uso cosmético (multifuncionalidade).

Os desenhos dos estudos de eficácia foram baseados na prática do mercado cosmético para as atividades de interesse, conforme descrito nos itens abaixo.

Além disso, os estudos foram escolhidos de acordo com as características das moléculas derivadas de xilitol

3.2.1. Formulações para os estudos clínicos

As formulações utilizadas nos testes clínicos foram preparadas no laboratório de assistência técnica da empresa Chemyunion Química Ltda. – Sorocaba, SP. Monoéster de C-8 Xilitol foi adicionado a 1,5% enquanto que Ésteres de Fosfato de Xilitol foram adicionados a 3,0%. Estas concentrações foram determinadas através de testes de eficácia da atividade conservante (MIC – Concentração Inibitória Mínima e *Challenge Test*) com os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*.

Para alguns ensaios, as formulações também foram preparadas sem os compostos para comparação com as atividade demonstradas pelas preparações testadas.

A escolha dos estudos clínicos foi feita com base na estrutura molecular dos compostos e os possíveis mecanismos de ação relacionados (Tabela 13).

Para Ésteres de Fosfato de Xilitol foram realizados os testes de atividade desodorante, anti-caspa e redução da oleosidade. O mecanismo de ação possível é a formação filmógena e pequena esfoliação na pele, promovidos pela fibra de xilitol e redução da atividade de água em função das hidroxilas livres na molécula. Além disso, há também atividade anti-fúngica, através da inibição de enzimas glicolíticas (glicosilação) e inibição da fosforilação.

Para Monoéster de C-8 Xilitol foi realizado o estudo de perda de água transepidérmica e manutenção da água. A molécula possui propriedade protetora da barreira cutânea, umectante e co-emulsionante.

Tabela 13: Testes clínicos de segurança e eficácia realizados

Substância	Teste de segurança	Teste para verificação da multifuncionalidade
Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%)	Compatibilidade – PC5	Sebumetria (oleosidade)
	Alergenicidade – HRIPT	Anti-caspa (oleosidade)
	Aceitabilidade cutânea e ocular	<i>Sniff test</i> (desodorante)
		Apreciabilidade cosmética
Monoéster de C-8 Xilitol (1,5%)	Compatibilidade – PC5	TEWL (manutenção da barreira cutânea)
	Alergenicidade – HRIPT	Raman (manutenção da água)
		Apreciabilidade cosmética

3.2.1.1. Bálsamo pós-barba – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%)

O bálsamo pós-barba foi preparado em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas listadas na Tabela 14 por meio da nomenclatura internacional de

ingredientes cosméticos (INCI).

As matérias-primas da fase A foram adicionadas em um béquer e homogeneizadas. Em outro béquer, as matérias-primas da fase B foram misturadas até total homogeneização. Em seguida, a fase B foi adicionada sobre a fase A em agitação vigorosa por aproximadamente 10 minutos. Após este período, a fase C foi adicionada à mistura, sendo mantida em agitação até completa homogeneização e finalmente a fase D foi adicionada.

Tabela 14: Composição do bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Fases	Componentes	Função	Concentração (% p/p)
A	Polyacrylamide (and) C13-C14	Formador de filme e condicionante da pele	3,50
	Isoparafinn (and) Laureth-7		
	Cyclomethicone (and) Dimethicone Crosspolymer	Emoliente	10,00
B	Cyclomethicone	Emoliente	10,00
	Divinyldimethicone/ Dimethicone Copolymer (and) C12-C13 Pareth-3 (and) C12-C13 Pareth-23	Condicionante da pele	5,00
	Aqua	Solvente	q.s.p. 100,00
C	Xylitol Phosphate Esters	Conservante/ Ativo	3,00
	Potassium Sorbate	Conservante	0,30
D	Phenoxyethanol	Conservante	0,70

3.2.1.2. Loção Tônica Capilar – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%)

A loção tônica capilar foi preparada em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas listadas na Tabela 15 por meio da nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI).

As matérias-primas da fase A foram adicionadas em um béquer e homogeneizadas. Em seguida, a fase B foi adicionada sobre a fase A em agitação

vigorosa por aproximadamente 10 minutos.

Tabela 15: Composição da loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Fases	Componentes	Função	Concentração (% p/p)
A	Aqua	Solvente	q.s.p. 100,00
	Xylitol Phosphate Esters	Conservante/ Ativo	3,00
	Glycerin	Emoliente	2,00
	Ethyl Alcohol (96%)	Solvente	20,00
B	DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate	Conservante	0,30

3.2.1.3. Shampoo – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%)

O shampoo foi preparado em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas listadas na Tabela 16 por meio da nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI).

Durante a preparação, a fase A foi aquecida em um béquer (aproximadamente 80-85° C). A fase B foi então adicionada à fase A, sob agitação. Em seguida, a fase C foi adicionada para ajuste do pH. A fase D foi adicionada também sob agitação. Finalmente, a fase E foi adicionada para ajuste de viscosidade.

Tabela 16: Composição do shampoo contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Fases	Componentes	Função	Concentração (% p/p)
	Aqua	Solvente	q.s.p. 100,00
	Dissodium EDTA	Conservante	0,10
A	Cocamidopropyl Betaine (30%)	Surfactante	4,00
	Sodium Lauryl Ether Sulfate (27%)	Surfactante	30,00
	Polyquaternium-7	Formador de filme	0,50
	Decyl Polyglucoside	Surfactante	2,00
B	PEG-120 Methyl Glucose Dioleate	Surfactante	1,50
	Phenoxyethanol	Conservante	0,50
C	Sodium Hydroxide (20%)	Ajustador de pH	q.s. pH= 6,5 – 7,0
	Aqua	Solvente	10,00
D	Xylitol Phosphate Esters	Conservante / Ativo	3,00
E	Sodium Chloride	Ajustador de viscosidade	q.s

3.2.1.4. Loção Tônica Facial – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%)

A loção tônica facial foi preparada em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas listadas na Tabela 17 por meio da nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI).

Na preparação, a fase A foi aquecida a aproximadamente 80-85° C. A fase B foi então adicionada a fase A sob agitação até temperatura ambiente. A fase C foi adicionada à mistura.

Tabela 17: Composição da loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Fases	Componentes	Função	Concentração (% p/p)
A	Aqua	Solvente	q.s.p. 100,00
	Xylitol Phosphate Esters	Conservante / Ativo	3,00
	Glycerin	Emoliente	3,00
	Ethyl Alcohol	Solvente	15,00
B	Sodium Hydroxide (20%)	Ajustador de pH	q.s. pH= 6,0 – 7,0
C	DMDM Hydantoin (and) Iodopropynyl Butylcarbamate	Conservante	0,30

3.2.1.5. Solução – Ésteres de Fosfato de Xilitol (3,0%)

A loção tônica facial foi preparada em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas listadas na Tabela 18 por meio da nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI).

As matérias-primas da fase A foram adicionadas em um béquer e homogeneizadas. Em outro béquer, foi adicionada a matéria-prima da fase B. Em seguida, a fase B foi adicionada sobre a fase A em agitação vigorosa por aproximadamente 10 minutos.

Tabela 18: Composição da solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Fases	Componentes	Função	Concentração (% p/p)
A	Aqua	Solvente	q.s.p. 100,00
	Xylitol Phosphate Esters	Conservante / Ativo	3,00
B	Sodium Hydroxide (20%)	Ajustador de pH	q.s. pH= 6,0 – 7,0

3.2.1.6. Loção Hidratante – Monoéster de C-8 Xilitol (1,5%)

A loção hidratante foi preparada em escala laboratorial utilizando-se as matérias-primas listadas na Tabela 19 por meio da nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI).

Durante a preparação, as fases A e B foram aquecidas separadamente a aproximadamente 80-85° C. A fase B foi então adicionada a fase A. A mistura foi emulsionada por 10mn no equipamento Ultra-turrax. Sob agitação, o resfriamento foi iniciado. A agitação foi mantida até a temperatura ambiente.

Tabela 19: Composição da loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol

Fases	Componentes	Função	Concentração (% p/p)
A	Cetearyl Alcohol (and) Cetareth-20	Surfactante	4,00
	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	Emoliente	2,00
	Cetearyl Alcohol	Estabilizante	2,00
	Mineral Oil	Emoliente	2,00
	C-8 Xylitol Monoester	Conservante / Ativo	1,50
B	Aqua	Solvente	q.s.p. 100,00
	Glycerin	Emoliente	2,00

3.2.2. Aspectos Éticos

Todos os estudos clínicos foram realizados de acordo com a Legislação Brasileira, baseada na “Resolução Normativa 196/96, CNS/MS”, tendo o consentimento e aprovação do comitê de ética em pesquisa (Anexo 3) (127).

Os riscos previsíveis incorridos pelos participantes da pesquisa que fizeram parte dos estudos foram mínimos, sendo que para este tipo de estudo poderiam ocorrer manifestação de alergia a uma determinada substância ou o possível aparecimento de uma irritação no local de aplicação, na forma de vermelhidão da pele, prurido, aquecimento, formigamento, repuxamento, queimação,

bolha, crosta, ressecamento ou alteração da cor da pele. Se isto ocorresse, a aplicação do produto seria suspensa, sendo colocada ao participante toda a assistência que se fizesse necessária.

Devido às exigências metodológicas, os participantes da pesquisa foram incluídos em diferentes dias, pois no caso de ocorrer uma reatividade significativa não esperada em um ou vários dos participantes incluídos inicialmente, o teste poderia ser descontinuado com o restante do painel.

Todos os participantes da pesquisa iniciaram o teste após devidamente informados e esclarecidos quanto à participação na pesquisa e forneceram seu consentimento informado, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

A pesquisa manteve o anonimato do participante, e sua saída voluntariamente do estudo foi garantida a qualquer momento. Todos foram esclarecidos dos possíveis riscos mais frequentes descritos na literatura para a categoria do produto, como dermatite de contato tipo irritativa / alérgica.

3.2.3. Estudos clínicos de Segurança

3.2.3.1. Compatibilidade cutânea

A metodologia utilizada foi uma adaptação do ROAT – *Repeated Open Application Test* (128), sendo que o produto foi aplicado na região da dobra do braço (PC5 – *Pli du Coude*).

O objetivo deste estudo foi verificar a compatibilidade cutânea de um produto contendo moléculas derivadas de xilitol após aplicações repetidas por 5 dias consecutivos.

O número mínimo de participantes de pesquisa foi 10.

Conforme figura 17, a aplicação do produto (0,2mL) foi realizada em uma área de 40cm² da dobra da superfície volar do braço duas vezes ao dia nos 4 primeiros dias do estudo e uma vez ao dia no último dia. A primeira aplicação diária ocorreu no laboratório por um técnico. Durante esta aplicação, o participante de pesquisa deveria flexionar o braço por 15 minutos e depois desse período, deixá-lo 30 minutos estendido. Ao final dos 45 minutos, foi realizado exame clínico por um

médico dermatologista a fim de verificar se houve alguma alteração da pele. Foram verificados sinais clínicos (por exemplo: eritema, edema) e o participante também poderia relatar possíveis sensações de desconforto (por exemplo: ardência, pinicamento). A segunda aplicação ocorreu em domicílio pelo participante da pesquisa e não foi necessário realizar o procedimento de flexão e extensão do braço.

O produto teste (formulação contendo uma das moléculas derivadas de xilitol) foi aplicado em um dos braços e o produto placebo (formulação sem os compostos derivados de xilitol) foi aplicado no outro braço a fim excluir a interferência da formulação no estudo e possibilitar a verificação apenas dos efeitos de Ésteres de Fosfato de Xilitol ou Monoéster de C-8 Xilitol sobre a pele.



Figura 17: Teste clínico PC5

Ao final dos 5 dias, os resultados foram avaliados e classificados conforme a Tabela 20.

Tabela 20: Classificação da compatibilidade cutânea (95)

Compatibilidade cutânea	Participantes com sinais clínicos (%)	Participantes com sensação de desconforto (%)
Muito boa	0	0
Boa	0	< 30
Moderada	< 20	+/-
	0	30 – 50%
Ruim	≥ 20	+/-
	0	> 50%

3.2.3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas de 18 a 60 anos, de gênero masculino ou feminino e com fototipo de I a IV, conforme a classificação de Fitzpatrick (127).

Não poderiam ser incluídas no estudo pessoas com marcas cutâneas na área de aplicação de produto que pudessem interferir na avaliação, tais como pigmentação cutânea e cicatrizes, histórico de atopia ou reatividade a categoria de produtos testados, alergia a látex, uso de medicamento antiinflamatório ou imunossupressor, tratamento com ácido retinóico ou seus derivados 3 meses antes do estudo, tratamento com corticóides tópicos há 8 dias antes do estudo, previsão de exposição solar intensa ou vacinação durante o período do estudo, mulheres grávidas ou em amamentação.

3.2.3.1.2. Restrições do estudo

Os participantes da pesquisa foram orientados a não utilizar nenhum outro produto na região do teste, não alterar hábitos de higiene e alimentar, não se expor ao sol e não utilizar medicamentos anti-alérgicos ou antiinflamatórios durante o período do teste.

3.2.3.2. Potencial alergênico

A metodologia utilizada para avaliação do potencial alergênico foi o HRIPT – *Human Repeated Insult Patch Test* (129, 130), conforme figuras 18 e 19.

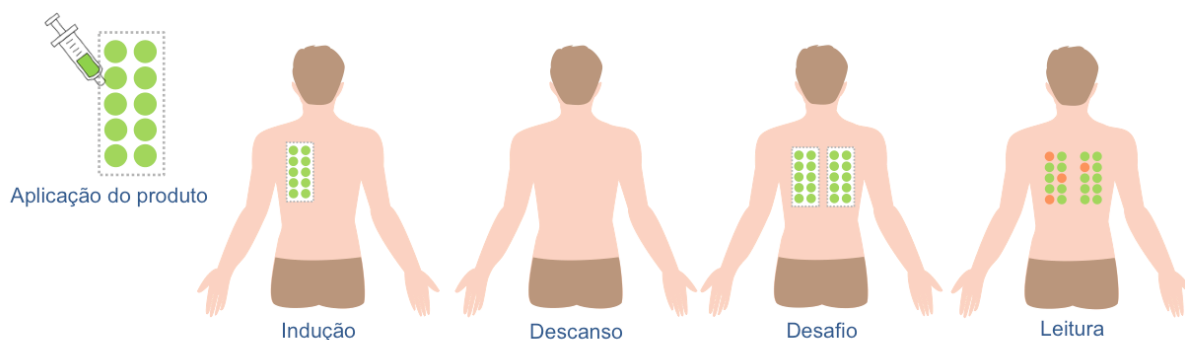


Figura 18: Teste clínico de alergenicidade – HRIPT

Dias do estudo	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Semana 1	Aplicação	Casa	Aplicação Avaliação	Casa	Aplicação Avaliação	Casa	Casa
Semana 2	Aplicação	Casa	Aplicação Avaliação	Casa	Aplicação Avaliação	Casa	Casa
Semana 3	Aplicação	Casa	Aplicação Avaliação	Casa	Aplicação Avaliação	Casa	Casa
Semana 4	Avaliação	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso
Semana 5	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso	Descanso
Semana 6	Aplicação	Casa	Avaliação	Casa	Avaliação	/	/

Figura 19: Cronograma do HRIPT

O objetivo deste estudo foi verificar o potencial alergênico de um produto contendo moléculas derivadas de xilitol.

O número mínimo de participantes de pesquisa foi 50 (95).

A quantidade de 0,02mL de produto teste em adesivos semi-oclusivos feitos de filtro de papel (100% celulose com 1cm de diâmetro) e fita adesiva Micropore® semi permeável foram aplicados nas costas dos participantes de pesquisa. 0,9% NaCl foi utilizado como controle negativo.

Após 48h, os participantes de pesquisa retornaram ao laboratório para remoção dos adesivos. Uma avaliação da área foi realizada após 30 minutos. A escala de avaliação utilizada foi aquela recomendada pelo ICDRG (*International Research Contact Dermatitis Group*), descrita na tabela 20. Novos adesivos foram colocados na mesma área e, após 48h, o procedimento de remoção e avaliação foi realizado novamente. Após a aplicação dos novos adesivos pela terceira vez, os participantes só retornaram ao laboratório após 96h. O procedimento previamente descrito (3 aplicações) foi realizado por mais 2 vezes (fase de indução).

Tabela 21: Classificação segundo o ICDRG

Classificação	Resultados	Grau
Ausente	Negativo (-)	Zero
Eritema leve	Duvidoso (?)	01
Eritema definido	Positivo (+)	02
Eritema + edema + pápulas	Positivo (++)	03
Eritema + edema + pápulas + vesículas	Positivo (+++)	04

Após a última aplicação, os participantes de pesquisa permaneceram 14 dias sem nenhum adesivo (período de descanso). Após este período de 2 semanas, os participantes de pesquisa retornaram ao laboratório para a fase desafio. Adesivos contendo o produto teste ou o controle negativo foram aplicados na mesma área da fase de indução e em uma outra área virgem. Após 48h, os participantes retornaram ao laboratório para avaliação e neste momento nenhum adesivo foi reaplicado.

Após um período de 24h-48h, foi realizada a última avaliação clínica.

3.2.3.2.1. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas de 18 a 60 anos, de gênero masculino ou feminino e com fototipo de I a IV, conforme a classificação de Fitzpatrick (127).

Não poderiam ser incluídas no estudo pessoas com marcas cutâneas na área de aplicação de produto que pudessem interferir na avaliação, tais como pigmentação cutânea e cicatrizes, histórico de atopia ou reatividade a categoria de produtos testados, alergia a látex, uso de medicamento antiinflamatório (30 dias antes do estudo) ou imunossupressor (3 meses antes do estudo), tratamento com ácido retinóico ou seus derivados 3 meses antes do estudo, doenças que podem causar supressão da imunidade, tal como diabetes, previsão de exposição solar intensa ou vacinação durante o período do estudo, mulheres grávidas ou em amamentação.

3.2.3.2. Restrições do estudo

Os participantes da pesquisa foram orientados a não utilizar nenhum outro produto na região do teste, não alterar hábitos de higiene e alimentar, não se expor ao sol e não utilizar medicamentos anti-alérgicos ou antiinflamatórios durante o período do teste.

3.2.3.3. Aceitabilidade cutânea e ocular

O objetivo deste estudo foi verificar a aceitabilidade cutânea e ocular de um produto contendo moléculas derivadas de xilitol.

A aceitabilidade cutânea e ocular foram verificadas todos os dias, pelos próprios participantes da pesquisa em domicílio e controlada após exame cutâneo e ocular visual das áreas experimentais realizado pelo médico dermatologista e oftalmologista no início e após 28 dias de estudo.

O número mínimo de participantes de pesquisa foi 30 (95).

Os participantes compareceram no laboratório no primeiro dia do estudo e foram examinados pelos médicos dermatologista e oftalmologista. Eles receberam instruções para o uso do produto em domicílio (Tabela 22). Após 28 dias de uso do produto em casa, os participantes retornaram ao laboratório para que novas avaliações clínicas com os médicos especialistas fossem realizadas e para que relatassem possíveis sensações de desconforto durante o uso do produto.

Tabela 22: Modo de uso dos produtos no teste de aceitabilidade

Produto	Modo de uso
Bálsamo pós-barba com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol	Após barbear-se, aplicar o produto na face de acordo com o hábito usual do participante.
Loção Tônica Facial com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol	Aplicar o produto na face diariamente pela manhã e à noite e não enxaguar.
Shampoo com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol	Lavar a cabeça diariamente com o produto.
Loção tônica capilar com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol	Aplicar o tônico no couro cabeludo seco diariamente.

Os participantes da pesquisa anotaram diariamente em uma folha de observação individual recebida no início do estudo quaisquer reações observadas e/ou sensações de desconforto sentidas, utilizando suas próprias palavras para expressar o que sentiram.

As principais sensações de desconforto que poderiam ocorrer durante a aplicação do produto foram: aquecimento, formigamento, prurido (coceira), repuxamento, queimação, lacrimejamento. Os sinais clínicos visíveis poderiam ser: eritema, edema, vesícula, bolha, pápula, crosta, ressecamento, coloração, mácula.

A intensidade das sensações de desconforto, eritema, edema, ressecamento e discromia foram avaliados de acordo com uma escala ordinal: ligeira, moderada, intensa.

Todos os sinais clínicos ou sensações de desconfortos descritos foram anotados e classificados, considerando sua localização, duração, início de aparição em relação à aplicação dos produtos, frequência, intensidade, evolução, tratamento medicamentoso eventualmente adotado, atribuído ao produto. Também foram anotadas características usuais e não usuais dos sinais clínicos ou sensações de desconforto descritas, por questionamento dos voluntários sobre os efeitos observados quando aplicados produtos similares ao testado.

Em caso de sensação de desconforto na região ocular, os participantes comunicariam o pesquisador responsável do estudo e seriam submetidos à avaliação clínica oftalmológica. Neste caso, um exame da área periocular e da membrana mucosa ocular deveria ser realizado pelo oftalmologista, usando uma lâmpada de fenda e realizando teste com fluoresceína e teste BUT (*break-up time*).

As principais reações de desconforto que poderiam ocorrer durante a aplicação do produto são: lacrimejamento, hiperemia, ardência, secura ocular, fotofobia e desconforto visual (sensação de “areia”). Os possíveis sinais clínicos visíveis poderiam ser: eritema bulbar, papilar e palpebral, queratite pontual, ulcerações e modificação da secreção lacrimal.

Para o bálsamo após barba, não foi realizada aceitabilidade ocular, portanto o procedimento foi o mesmo acima descrito com exceção do exame pelo médico oftalmologista.

A interpretação dos resultados do exame cutâneo, do questionamento e dos dados obtidos da folha de observação individual foi realizada, considerou-se as reações de irritação observáveis visualmente (sinais clínicos), as sensações de desconforto descritas pelos voluntários e as manifestações eventualmente ocorridas em regiões onde o produto não foi aplicado.

De acordo com a natureza e a intensidade dos sinais clínicos e sensações de desconforto, foi possível classificar a aceitabilidade cutânea e ocular, conforme a Tabela 23.

Tabela 23: Classificação da aceitabilidade

Aceitabilidade	% participantes com sinais clínicos	% participantes com sensação de desconforto
Muito boa	0	0
Boa	0	< 25
Moderada	< 10	+/-
	0	25 – 50%
Ruim	≥ 10	+/-
	0	> 50%

3.2.3.3.1 Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas com fototipo de I a IV, conforme a classificação de Fitzpatrick (127). Dependendo do tipo de produto, houve critérios específicos a serem atendidos, conforme descrito nos itens abaixo.

Não poderiam ser incluídas no estudo pessoas com marcas cutâneas na área de aplicação de produto que pudessem interferir na avaliação, tais como pigmentação cutânea e cicatrizes, histórico de atopia ou reatividade a categoria de produtos testados, exposição solar intensa há 15 dias antes do estudo, tratamento com corticóides tópicos há 8 dias antes do estudo, uso de medicamento antiinflamatório (30 dias antes do estudo) ou imunossupressor (3 meses antes do estudo), tratamento com ácido retinóico ou seus derivados 3 meses antes do estudo, tratamentos estéticos há 4 semanas antes do estudo, doenças que pudessem

causar supressão da imunidade, tais como diabetes, previsão de exposição solar intensa ou vacinação durante o período do estudo, mulheres grávidas ou em amamentação.

3.2.3.3.2. Critérios de inclusão para o Bálsamo Pós Barba

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas de 18 a 45 anos, de gênero masculino, com hábito de fazer a barba com lâmina no mínimo 2 vezes por semana, com histórico de foliculite e irritação da pele após barbear-se.

3.2.3.3.3. Critérios de inclusão para a Loção Facial

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas de 12 a 45 anos, de gênero masculino, com acne grau I ou II (130), com pele mista ou oleosa e usuário de produto cosmético.

3.2.3.3.4. Critérios de inclusão para o Shampoo e a Loção Tônica Capilar

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas de 18 a 60 anos, de gênero masculino, com presença ou histórico de caspa e que não utilizaram nenhum produto anti-caspa nos 30 dias precedentes ao estudo.

3.2.3.3.5. Restrições do estudo

Os participantes da pesquisa foram orientados a não utilizar nenhum outro produto na região do teste, não alterar hábitos de higiene e alimentar, não se expor ao sol e não utilizar medicamentos anti-alérgicos ou antiinflamatórios durante o período do teste.

3.2.3.3.6. Análise estatística

Os resultados da aceitabilidade cutânea e ocular foram expressos de forma descritiva para os sinais revelados visualmente ou para as sensações de

desconforto, e a porcentagem de voluntários reativos foi calculada. Os dados obtidos foram comparados à tabela 23, que classifica o grau de aceitabilidade do produto conforme a porcentagem de voluntários reativos.

3.2.4. Estudos clínicos de multifuncionalidade

3.2.4.1. Manutenção da hidratação

3.2.4.1.1. Teste de TEWL (*Transepidermal Water Loss*)

Para a realização deste estudo foi utilizado o equipamento Tewameter TM 210 (Courage & Khazaka), acoplado a um software, a fim de medir a perda de água transepidérmica, pelo princípio de difusão descrito por Adolf Fick, conforme Equação 5 (131).

$$\frac{dm}{dt} = - D A \cdot \frac{dp}{dx}$$

Equação 5: Princípio de difusão de Fick

Onde dm/dt é o fluxo de difusão, A é a área, dp/dx é a alteração de concentração por distância e D é o coeficiente de difusão do vapor de água no ar. Os valores são dados em $g.m^2.h^{-1}$.

Para a realização das medidas, a sonda do aparelho permaneceu por 2 minutos sobre a pele na região do antebraço e o valor médio de 10 medidas obtidas neste intervalo de tempo foi empregado nos cálculos.

A região escolhida para a realização das medidas foi o antebraço de 4 participantes de pesquisa, pois é uma área muito empregada em estudos por apresentar vantagens como a facilidade de aplicação e avaliação e sofrer menor interferência das condições ambientais (96, 132-134). A área foi dividida em duas partes de $20cm^2$ cada, em uma área foi aplicado o produto contendo Monoéster de C-8 Xilitol, na outra o produto sem Monoéster de C-8 Xilitol e outra área não recebeu aplicação de nenhum produto (região controle). As aplicações ocorreram de forma

randomizada.

O estudo teve duração de 7 dias, sendo que as medidas foram realizadas no primeiro dia após 30 minutos e 7 dias da aplicação dos produtos.

As medidas foram realizadas em sala com controle de temperatura (21-22°C) e umidade (45-55%).

3.2.4.1.1.1. Análise estatística

Foi realizada análise de variância (*one way ANOVA*).

3.2.4.1.2. Avaliação do efeito potencial na hidratação da pele através do método Raman

O teste através da método Raman (135-137) foi realizado como estudo preliminar a fim de verificar o potencial efeito na hidratação do Monoéster de C-8 Xilitol.

3.2.4.1.2.1 Teste de hidratação da pele através do método Raman

Foi avaliado o perfil hídrico das camadas cutâneas após aplicação de Loção Hidratante com e sem Monoéster de C-8 Xilitol (1,5%).

Foi utilizado o espectroscópio Raman (Skin Analyzer Model 3510 – River Diagnostics), conforme figura 20.

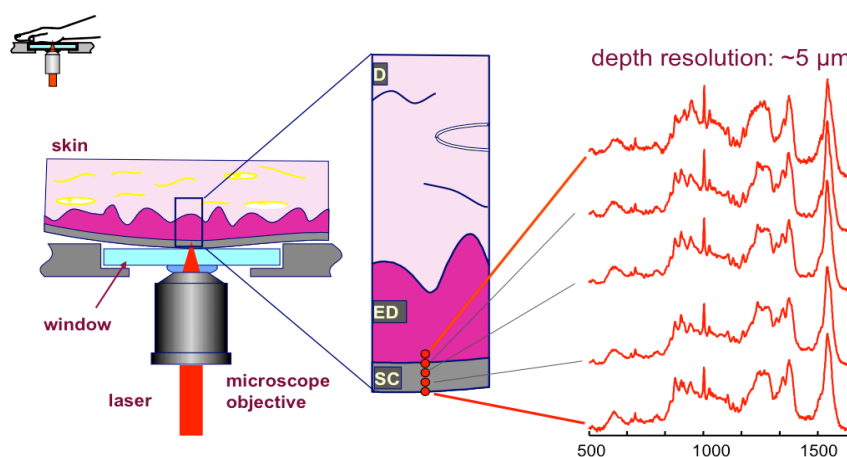


Figura 20: Princípio da medida através do espectroscópio Raman (River Diagnostics)

A região para a realização das medidas foram os antebraços (16cm²) após condicionamento climático (15 minutos). Foi realizada leitura basal antes da aplicação do produto. O produto teste foi aplicado (0,25 - 0,30mg) e após 1h, foi realizada nova leitura. O participante foi orientado a utilizar o produto em domicílio, 2 vezes ao dia (manhã e noite) durante 7 dias. Ao final deste período, foi realizada nova medida.

3.2.4.1.3. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

Idade de 35 a 45 anos e com fototipo de I a VI, conforme a classificação de Fitzpatrick (127), foram os critérios para inclusão de participante no estudo.

Não poderiam ser incluídas no estudo pessoas com marcas cutâneas na área de aplicação de produto que pudessem interferir na avaliação, tais como pigmentação cutânea e cicatrizes, portadores de diabetes, atopia, vitiligo, psoríase ou lupus, uso de medicamento antiinflamatório ou imunossupressor, antecedentes de reação a produtos da mesma categoria e mulheres grávidas ou em amamentação.

3.2.4.1.4. Restrições do estudo

Os participantes da pesquisa foram orientados a não utilizar nenhum outro produto na região do teste, não alterar hábitos de higiene e alimentar e não utilizar medicamentos anti-alérgicos ou antiinflamatórios durante o período do teste.

3.2.4.2. Atividade desodorante

3.2.4.2.1. Sniff-test

O objetivo do estudo foi comparar o efeito desodorante de um produto contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol e um produto com a mesma formulação, com exceção do composto derivado de xilitol, contendo uma substância de mercado com atividade desodorante de mercado (Triclosan), após 8h e 24h (138).

O número mínimo de participantes de pesquisa foi 10.

O estudo teve o seu início no período de condicionamento, no qual durante 21 dias, os participantes de pesquisa utilizaram um sabonete padrão e uma solução contendo água e álcool em domicílio a fim de remover qualquer resíduo de substância antiperspirante na região das axilas.

Após o período de condicionamento, os participantes compareceram ao laboratório e após lavagem da região das axilas, o produto contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol (400µL) foi aplicado em uma área de 150cm² em uma das axilas e outro produto contendo 3% de Triclosan foi aplicado na outra axila, durante 4 dias consecutivos. Todas as aplicações foram feitas no laboratório.

A avaliação do odor axilar foi feita por 3 técnicos treinados antes do período de condicionamento e após 8h e 24h da última aplicação do produto teste. Para a avaliação do odor, uma escala de 11 pontos foi utilizada (Tabela 23).

Tabela 24: Pontuação do odor axilar

Pontuação	Nível correspondente de intensidade de odor axilar
0	Nenhum – ausência de mau odor
1	Mau odor pouco perceptível
2	Mau odor levemente percebido
3	Mau odor fraco
4	Mau odor fraco a moderado
5	Mau odor moderado
6	Mau odor levemente forte
7	Mau odor moderadamente forte
8	Mau odor forte
9	Mau odor muito forte
11	Mau odor extremamente forte

3.2.4.2.2. Critérios de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa

Para a participação no estudo foram incluídas pessoas de 18 a 60 anos, de gênero feminino e com fototipo de I a VI, conforme a classificação de Fitzpatrick (127).

Não poderiam ser incluídas no estudo pessoas com marcas cutâneas na área de aplicação de produto que pudessem interferir na avaliação, tais como pigmentação cutânea e cicatrizes, portadores de diabetes, atopia, vitiligo, psoríase ou lúpus, uso de medicamento antiinflamatório ou imunossupressor, antecedentes de reação a produtos da mesma categoria, mulheres grávidas ou em amamentação e pessoas com pontuação de odor axilar menor que 3 nos dois braços no início do período de acondicionamento do estudo.

3.2.4.2.3. Restrições do estudo

Os participantes da pesquisa foram orientados a não utilizar nenhum outro produto na região do teste, não alterar hábitos de higiene e alimentar e não utilizar medicamentos anti-alérgicos ou antiinflamatórios durante o período do teste.

3.2.4.2.3. Análise estatística

Foi realizado teste-t e considerado 95% de intervalo de confiança.

3.2.4.3. Redução de oleosidade

3.2.4.3.1. Teste de sebumetria

O efeito na oleosidade da pele foi verificado através de medidas objetivas.

As medidas de sebumetria ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) foram realizadas no primeiro dia do estudo e/ou após 14 (para o Bálsamo pós barba) e 28 dias de uso de produto, após 12 horas da lavagem da área onde a medida foi realizada ($5,30\text{cm}^2$ na região frontal da cabeça para o Bálsamo pós-barba e para a Loção Tônica Facial e $6,80\text{ cm}^2$ na região frontal do couro cabeludo para a Loção Tônica Capilar).

O número mínimo de participantes de pesquisa foi 14, os quais participaram do teste de aceitabilidade. Portanto, os critérios de inclusão e exclusão são os mesmos descritos acima por tipo de produto.

O modo de uso do produto também foi igual àquele do teste de aceitabilidade, entretanto, os participantes de pesquisa aplicaram o produto também

na área frontal da cabeça.

Foi empregado o equipamento Sebometer® SM 810 (Courage & Khazaka) que mede a oleosidade cutânea baseado na fotometria de uma fita plástica especial de 0,1mm de espessura disposta em um carretel avançado manualmente a cada leitura, que se torna transparente quando em contato com lipídios. Sob esta fita há uma pequena superfície espelhada que reflete a luz através da fita (Figura 21) medindo indiretamente o volume de secreção sebácea das glândulas (31).

A leitura foi realizada aplicando sobre a área de teste a fita e pressionando por trinta segundos. Em seguida esta foi inserida no aparelho que fez a leitura fotométrica da transparência. Este dado é convertido pelo aparelho sendo o resultado expresso em μg de sebo por cm^2 .

Adicionalmente, foram realizadas medidas de sebumetria em 14 pessoas, as quais não utilizaram nenhum produto para verificar o perfil de oleosidade em 28 dias (Grupo Controle).

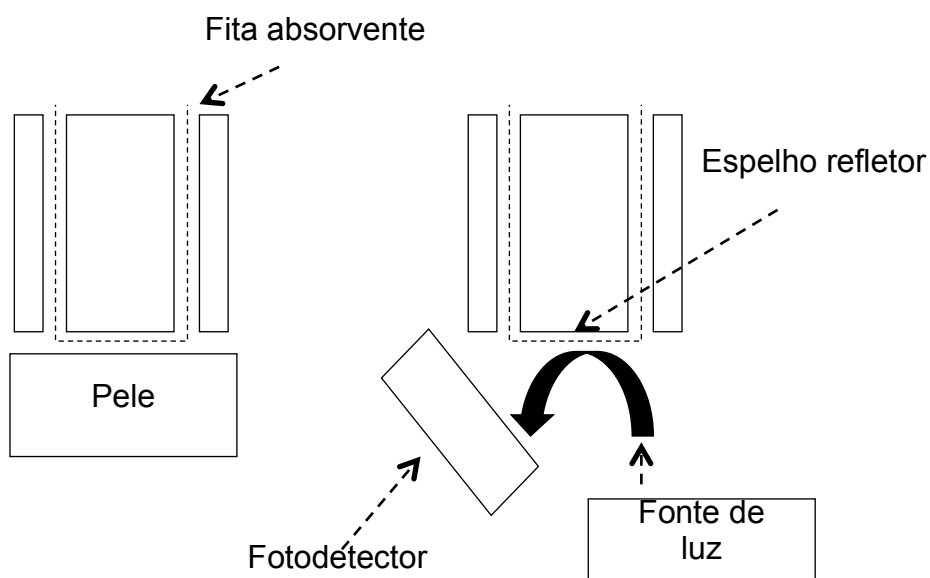


Figura 21: Princípio da medida de Sebumetria (31)

3.2.4.3.2. Análise estatística

Foi realizada análise estatística através de Teste-t.

3.2.4.4. Avaliação da Apreciabilidade Cosmética

3.2.4.4.1. Teste de Apreciabilidade Cosmética

A metodologia adotada preconizou o uso em domicílio dos produtos por 28 dias, proporcionando avaliar a apreciabilidade e percepção dos participantes de pesquisa sobre a eficácia do produto.

A apreciabilidade cosmética foi realizada através de perguntas feitas ao participante da pesquisa após utilização do produto teste.

O número mínimo de participantes de pesquisa foi 30, os quais participaram do teste de aceitabilidade. Portanto, os critérios de inclusão e exclusão são os mesmos descritos acima por tipo de produto.

O modo de uso do produto e tempo de estudo também foi igual àquele do teste de aceitabilidade.

A avaliação subjetiva da percepção da eficácia cosmética foi verificada por um questionário dirigido respondido pelos participantes de pesquisa no último dia do estudo.

Para os participantes que utilizaram o shampoo e loção tônica capilar as seguintes perguntas foram feitas:

- No primeiro dia do estudo e após 28 dias de uso do produto
 1. Como você classifica a intensidade da sua caspa – leve, moderada ou intensa?
- Após 28 dias de uso do produto
 1. Você percebeu melhora na oleosidade do seu couro cabeludo?
 2. Você percebeu melhora na oleosidade do cabelo?
 3. Você percebeu diminuição da caspa?
 4. Você percebeu redução da caspa que cai na sua roupa?
 5. Você percebeu melhora da coceira do couro cabeludo?
 6. Você percebeu redução da queda capilar?

7. Em relação ao tratamento, qual o seu grau de satisfação – baixo, moderado ou alto?
8. Você compraria o produto se ele estivesse a venda?

Para os participantes que utilizaram a loção tônica facial, as seguintes perguntas foram feitas após 28 dias de uso do produto:

1. Você percebeu melhora na oleosidade da pele?
2. Você percebeu redução de comedões?
3. Você percebeu redução de espinhas?
4. Você percebeu redução da inflamação da pele?
5. Você percebeu que sua pele está mais hidratada?
6. Em relação ao tratamento, qual o seu grau de satisfação – baixo, moderado ou alto?
7. Você compraria o produto se ele estivesse a venda?

Para os participantes que utilizaram o bálsamo pós-barba, as seguintes perguntas foram feitas após 28 dias de uso do produto:

1. Você percebeu melhora na oleosidade da pele?
2. Você percebeu redução da inflamação dos comedões e espinhas?
3. Você percebeu redução da inflamação da área da barba?
4. Você percebeu que a área da barba está menos inflamada?
5. A sensação de pinicamento diminuiu após barbear-se?
6. A sensação de coceira diminuiu após barbear-se?
7. Você percebeu diminuição da vermelhidão da pele após barbear-se?
8. Você percebeu que sua pele está mais hidratada?
9. Em relação ao tratamento, qual o seu grau de satisfação – baixo, moderado ou alto?
10. Você compraria o produto se ele estivesse a venda?

3.2.4.4.2. Análise estatística

A apreciabilidade cosmética quanto à multifuncionalidade do produto testado foi expressa em porcentagem de respostas positivas.

4. RESULTADOS

Devido ao grande número de ensaios realizados neste trabalho, nas Tabelas 25 a 28, há um resumo dos resultados obtidos.

Os resultados detalhados encontram-se nos Apêndices 1 ao 13 e no item Discussão.

Tabela 25: Resultados da predição *in silico*

Predição <i>in silico</i>	Resultado do EPX*	Resultado do MCX**
Sensibilização	Nenhum alerta	Nenhum alerta
Reação de Michael	Não reativo	Não reativo
Irritação cutânea	Não irritante / corrosivo	Não irritante / corrosivo
Irritação ocular	Não corrosivo	Não corrosivo
Regra de Cramer	Classe III	Classe II
TTC	Dados específicos de toxicidade necessários	Não é esperada preocupação de segurança
Micronúcleo	Nenhum alerta	Nenhum alerta
Mutagenicidade	Nenhum alerta	Nenhum alerta
Carcinogenicidade	Nenhum alerta	Nenhum alerta
Biodegradabilidade	Facilmente biodegradável	Facilmente biodegradável

Legenda: * EPX – Ésteres de Fosfato de Xilitol, ** MCX – Monoéster de C-8 Xilitol

Tabela 26: Resultados dos ensaios *in vitro*

Ensaio <i>in vitro</i>	Resultado do EPX*	Resultado do MCX**
Biodegradabilidade	Facilmente biodegradável	Facilmente biodegradável
Citotoxicidade	IC ₅₀ = 23,61	IC ₅₀ = 0,042
Fototoxicidade	Não fototóxico	Não fototóxico
Irritação ocular – HET-CAM	Moderadamente irritante	Irritante
Irritação ocular – BCOP	Não realizado	Fracamente irritante ^a

Legenda: * EPX – Ésteres de Fosfato de Xilitol (Puro), ** MCX – Monoéster de C-8 Xilitol (Puro), ^a MCX – Monoéster de C-8 Xilitol a 10%

Tabela 27: Resultados dos estudos clínicos de segurança

Estudo clínico	Resultado do EPX* 3%	Resultado do MCX** 1,5%
Compatibilidade cutânea – PC5	Compatibilidade muito boa	Compatibilidade muito boa
Alergenicidade – HRIPT	Não alergênico	Não alergênico
Aceitabilidade cutânea	Aceitabilidade moderada a boa	Não realizado
Aceitabilidade ocular	Aceitabilidade boa	Não realizado

Legenda: * EPX – Ésteres de Fosfato de Xilitol, ** MCX – Monoéster de C-8 Xilitol

Tabela 28: Resultados dos estudos clínicos para multifuncionalidade

Estudo clínico	Resultado do EPX* 3%	Resultado do MCX** 1,5%
Oleosidade da pele	Redução da oleosidade após 28 dias de uso	Não realizado
Efeito desodorante	Efeito comparável ao Triclosan	Não realizado
TEWL – Perda de água transepidérmica	Não realizado	Diminuição da perda de água transepidérmica
Raman	Não realizado	Manutenção do teor de água da pele
Apreciabilidade cosmética	Bem apreciado	Não realizado

Legenda: * EPX – Ésteres de Fosfato de Xilitol, ** MCX – Monoéster de C-8 Xilitol

5. DISCUSSÃO

Devido ao grande número de ensaios realizados neste trabalho, neste item estão descritos os resultados de forma mais detalhada e a discussão.

5.1. Estudos pré-clínicos

5.1.1. Predição *in silico* para avaliação da segurança

Para avaliação *in silico* realizada neste trabalho, foram escolhidas 20 substâncias com atividade conservante comprovada na literatura, disponíveis no mercado e amplamente utilizadas em produtos cosméticos para comparação com as moléculas derivadas de xilitol (versões mono, di, e tri dos ésteres de fosfato de xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol). O objetivo da utilização deste método era verificar se as moléculas candidatas apresentariam características toxicológicas similares ou melhores do que as substâncias de mercado escolhidas. Os resumo dos resultados da predição *in silico* das moléculas derivadas de xilitol estão na Tabela 29.

Tabela 29: Resumo dos resultados da predição *in silico*

Parâmetro	Monoéster de C-8 xilitol	Ésteres de xilitol fosfato
Mutagenicidade	×	×
Irritação/Corrosão cutânea	×	×
Sensibilização	×	×
Biodegradabilidade imediata	✓	✓
Potencial de permeação (LogKow*)	×	×
	(0,80)	(Mono: -3,23 / Di: -6,10 / Tri: - 8,97)

Legenda: ×- resultado negativo, ✓ - resultado positivo, *Baixo potencial de permeação: LogKoW < 1 ou > 4

Os dados detalhados da predição *in silico* encontram-se nos Apêndices 2 e 3. Considerando o uso potencial em cosméticos das moléculas candidatas, foram escolhidos os parâmetros sensibilização cutânea, irritação cutânea e ocular, mutagenicidade, carcinogenicidade, regras de Cramer e TTC (Threshold of Toxicological Concern - Limiar em que não se espera preocupação toxicológica) para avaliação inicial.

O conceito do TTC se refere ao estabelecimento de um nível de exposição oral no qual não se é esperado risco à saúde humana. É utilizado na ausência de dados toxicológicos específicos da substância de interesse e também é requisito regulatório para produtos de degradação e metabólitos. Inicialmente, era utilizado na avaliação de aditivos alimentares indiretos e flavorizantes alimentícios, mas sua aplicação em outras áreas tem sido estudada. A árvore decisória do TTC proposta por Kroes resulta em três alternativas: (1) não é esperada preocupação de segurança para a substância, (2) risco negligenciável e (3) são necessários dados específicos do composto para realizar a avaliação do risco (139).

Assim como o TTC, a árvore decisória de Cramer é utilizada para classificar substâncias de acordo com a toxicidade oral. Esta árvore engloba uma série de perguntas sobre a possibilidade de toxicidade das substâncias de interesse, sendo que são classificadas como Classe I as substâncias de estrutura química simples e para as quais há meios de metabolização eficientes, sugerindo, portanto, baixa toxicidade oral; Classe II são as substâncias com estrutura mais complexa, mas que não contêm características estruturais sugestivas de toxicidade tais como a Classe III, na qual são contempladas substâncias com estruturas químicas que podem sugerir toxicidade significativa ou podem possuir grupos funcionais reativos (140).

Neste estudo, para Monoéster de C-8 Xilitol e para as substâncias de mercado, a análise do TTC resultou na alternativa 1, enquanto que para os Ésteres de Fosfato de Xilitol foi sinalizada a necessidade de informações adicionais para a avaliação de risco. Além disso, devido a estrutura química mais complexa, Ésteres de Fosfato de Xilitol foram classificados como Classe Cramer III e Monoéster de C-8 Xilitol como Classe II. Nove compostos que estão disponíveis no Mercado e são utilizados tanto em produtos cosméticos quanto na área de alimentos e farmacêutica, tais como Ácido sórbico e DMDM Hidantoína, foram classificados

como Classe III e o conservante Fenoxietanol como Classe II.

Além da avaliação dos resultados da predição de forma isolada para as moléculas derivadas de xilitol, conforme descrito na tabela 29, os dados gerados também possibilitaram a comparação dos parâmetros das moléculas com atividade conservante já utilizadas com os resultados obtidos para os Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol.

Primeiramente, foi realizada a transformação nas variáveis para que se pudessem criar tabelas cruzadas. As variáveis usadas foram: substância, sensibilização cutânea, irritação cutânea, mutagenicidade/ carcinogenicidade, regras de Cramer e LogKoW. Após as transformações necessárias, dividiram-se os dados em dois grupos. O primeiro com 4 substâncias de interesse (moléculas derivadas de xilitol) e o segundo grupo com 20 substâncias de comparação (compostos de mercado com atividade conservante).

Com o intuito de verificar a existência de diferenças entre os grupos, o teste exato de Fisher foi aplicado para as variáveis sensibilização cutânea, irritação cutânea e mutagenicidade/ carcinogenicidade, o teste de Mann-Whitney U para a variável Regras de Cramer e teste T da diferença das médias para a variável LogKoW.

Portanto, de acordo com os valores de p apresentados, apenas no teste T rejeita-se a hipótese de igualdade dos grupos quando se compara a variável logKoW. A maioria dos conservantes disponíveis no mercado apresentam logKoW entre 1 e 4, além do baixo peso molecular, resultando em alta capacidade de permeação, favorecendo a ocorrência de dermatites de contato. Ao contrário, as moléculas derivadas apresentam Log KoW abaixo de 1, sugerindo baixo potencial de permeação, sugerindo maior proteção da barreira cutânea.

Nos demais testes apresentados, a hipótese não é rejeitada, ou seja, não há diferença estatística entre os grupos. Portanto, o perfil toxicológico obtido a partir da avaliação *in silico* de todas substâncias de mercado e das moléculas derivadas de xilitol é similar ($p < 0,100$). Este resultado sugere que as moléculas derivadas de xilitol demonstraram-se potencialmente seguras na etapa inicial da avaliação de segurança e, portanto, testes *in vitro* foram realizados.

5.1.2. Citotoxicidade *in vitro*

Os testes de viabilidade celular medem a proporção de células viáveis após um procedimento traumático e fornecem, portanto, informações quanto a respostas imediatas (83). Estes testes estão entre os primeiros a serem realizados na avaliação de substâncias e tem como base a ruptura da integridade da membrana, a qual é determinada pela entrada de um corante na célula. São ensaios simples, rápidos e econômicos (115, 141, 142).

Em algumas situações, os resultados dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem não estar diretamente relacionados aos resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, entretanto, pode-se afirmar que se um material induz uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é bem provável que irá demonstrar potencial citotóxico quando aplicado em tecidos vivos (141). Os resultados para avaliação da citotoxicidade *in vitro* são utilizados para determinar a toxicidade e para estimar o valor da IC_{50} de substâncias químicas.

O IC_{50} dos ésteres de fosfato de xilitol e do monoéster de C-8 xilitol (0,0001–50,00 mg/mL) foi determinado após 48 horas de incubação pelo método do MTT em fibroblastos humanos (Figura 22). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

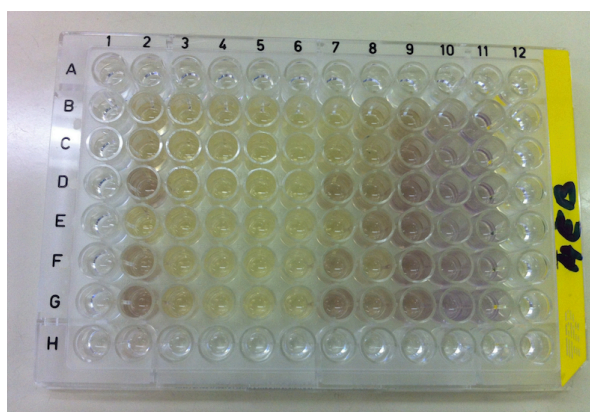


Figura 22: Placa de 96 poços utilizada na avaliação da citotoxicidade das moléculas derivadas de xilitol em fibroblastos humanos pelo método do MTT. (Foto da autora).

Conforme resultados apresentados nas Figuras 23 e 24, as moléculas derivadas de xilitol apresentaram valores de IC_{50} de 23,61mg/mL para os Ésteres de Fosfato de Xilitol e 0,04mg/mL para Monoéster de C-8 Xilitol.

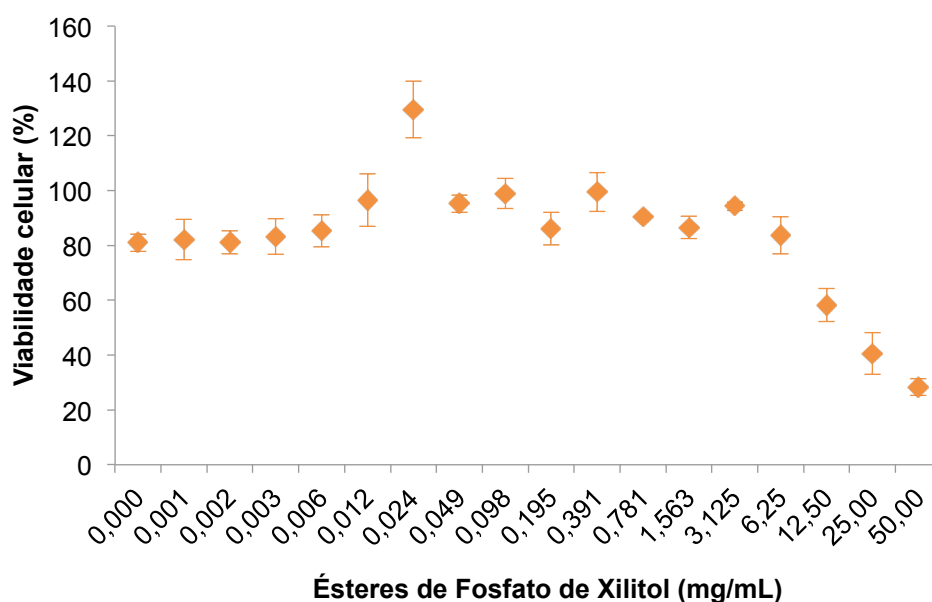


Figura 23: Avaliação de citotoxicidade dos Ésteres de Fosfato de Xilitol em fibroblastos humanos pelo método do MTT.

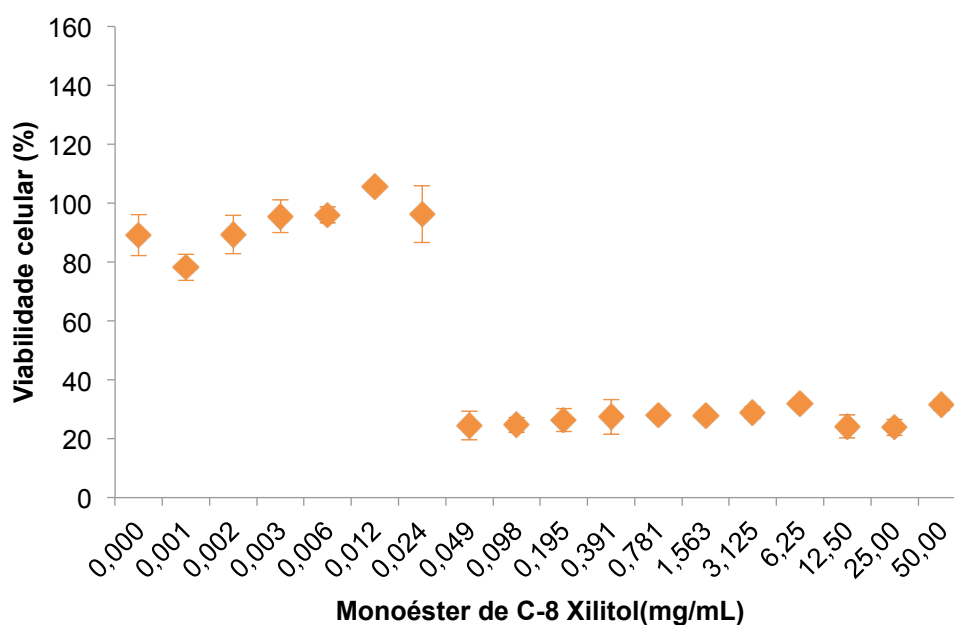


Figura 24: Avaliação de citotoxicidade do Monoéster de C-8 Xilitol em fibroblastos humanos pelo método do MTT.

Os testes de citotoxicidade têm sido utilizados como ferramenta para

entedimento dos mecanismos relacionados à toxicidade. Conforme o guia da OECD 129 (142, 143), este ensaio é utilizado para determinar as doses iniciais para testes de toxicidade aguda oral em roedores. Algumas iniciativas na Alemanha e na Califórnia vêm, através de banco de dados, trabalhando na predição da DL_{50} a partir da IC_{50} . Neste trabalho, utilizamos esta abordagem, sugerindo a classificação das moléculas derivadas de xilitol conforme os dados apresentados na tabela 30 (144).

Tabela 30: Estimativa da DL_{50} em função do IC_{50}

	IC_{50} (mg/mL)	Estimativa da DL_{50} (mg/kg)	Escala de Hodge e Sterne, 2005
MCX	0,042	424,47	Toxicidade moderada (5-500mg/kg)
EPX	23,612	4475,12	Toxicidade baixa (500-5000mg/kg)

Legenda: MCX – Monoéster de C-8 Xilitol, EPX – Ésteres de Xilitol Fosfato

Devido a ação antimicrobiana, é esperado que substâncias com atividade conservante apresentem toxicidade a células em cultura. Estudos demonstraram que substâncias utilizadas como conservantes (fenoxietanol, propilparabeno, metilparabeno, álcool benzílico e etilexilglicerina) são citotóxicos e induzem apoptose celular (145). Os resultados deste trabalho indicam que tanto os Ésteres de Fosfato de Xilitol quanto o Monoéster de C-8 Xilitol apresentaram toxicidade no teste de viabilidade celular. Entretanto, é importante ressaltar que ativos cosméticos e conservantes são utilizados em pequenas quantidades em produtos e portanto esta condição deve ser considerada na avaliação do risco.

5.1.3. Fototoxicidade *in vitro*

O potencial fototóxico das substâncias químicas pode ser avaliado de forma eficaz por métodos *in vitro*. O ensaio de fototoxicidade pelo método 3T3 NRU é um método validado e aceito por agências regulatórias como método para

determinação do potencial fototóxico. Neste teste, comparam-se as diferenças de toxicidade entre as placas do controle negativo, não expostas à radiação UVA e placas de teste, expostas a radiação. Este teste tem a capacidade de identificar substâncias potencialmente fotoirritantes e fototóxicos quando são aplicadas na pele.

Várias substâncias químicas apresentam preocupação quanto à fototoxicidade devido à presença de anéis aromáticos como grupos cromóforos em sua estrutura com a capacidade de absorver luz UV. Assim, o método validado pela OECD através do guia número 432 é capaz de identificar uma resposta tóxica de uma substância a qual é aumentada ou elicitada após a exposição a irradiação UV (146).

A segurança em relação à ocorrência de respostas à luz UV dos compostos é essencial na avaliação de cosméticos, evitando assim as manifestações clínicas compatíveis com eritema, coceira e edema decorrentes do contato de substâncias fotorreativas com a pele.

As Figuras 25 e 26 apresentam os resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade realizados com as moléculas derivadas de xilitol. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Para os Ésteres de Fosfato de Xilitol, os valores de IC_{50} são 18,36 no escuro e 50,0 com UVA, determinados por meio da análise de interpolação linear. Para o Monoéster de C-8 Xilitol, os valores de IC_{50} são 0,031 para as amostras mantidas no escuro 0,41 para as amostras submetidas à radiação UVA, 5 J/cm². Portanto, o fator de fotoirritação (PIF) para os Ésteres de Fosfato de Xilitol é 0,36 enquanto que para o Monoéster de C-8 Xilitol é 0,08 e nenhum dos compostos apresentou potencial fototóxico (Tabela 31 e Figura 27).

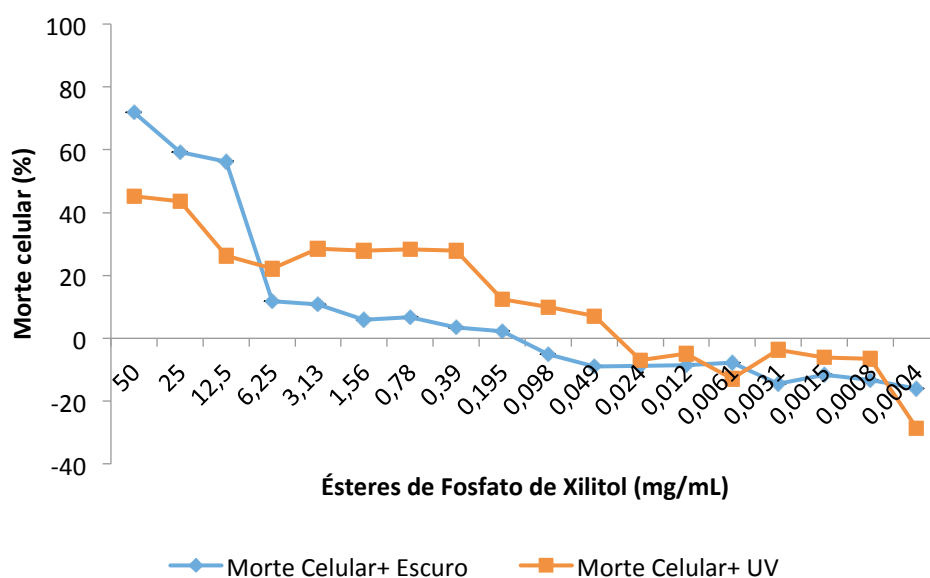


Figura 25. Avaliação do potencial fototóxico dos Ésteres de Fosfato de Xilitol em fibroblastos murinos pelo método do vermelho neutro (3T3 RNU).

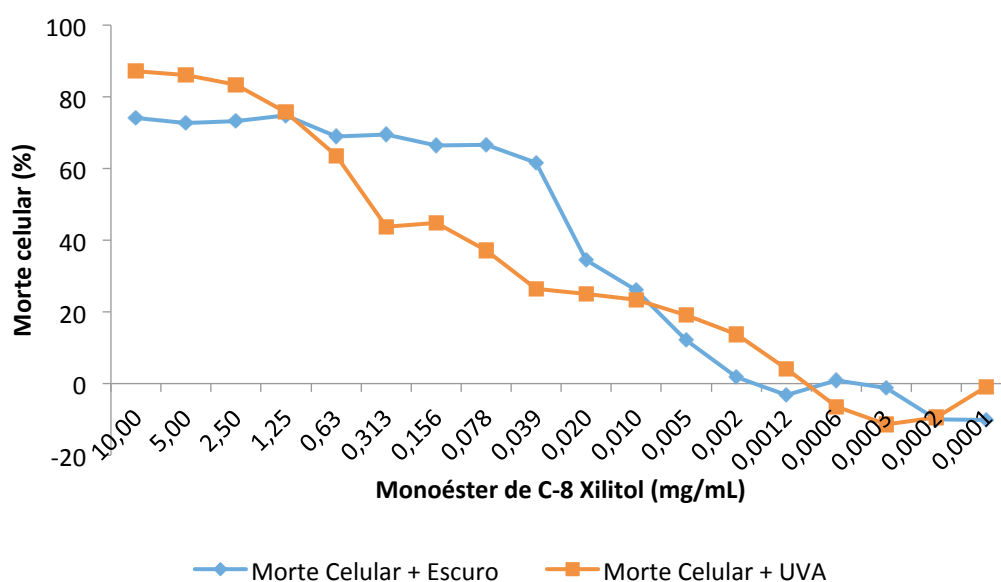


Figura 26. Avaliação do potencial fototóxico do Monoéster de C-8 Xilitol em fibroblastos murinos pelo método do vermelho neutro (3T3 RNU).

Tabela 31. Valores IC_{50} no ensaio de fototoxicidade

	MCX (mg/mL)	EPX (mg/mL)
IC_{50} (- UVA)	0,03	18,36
IC_{50} (+UVA)	0,41	50,00

Legenda: MCX – Monoéster de C-8 Xilitol, EPX – Ésteres de Fosfato de Xilitol

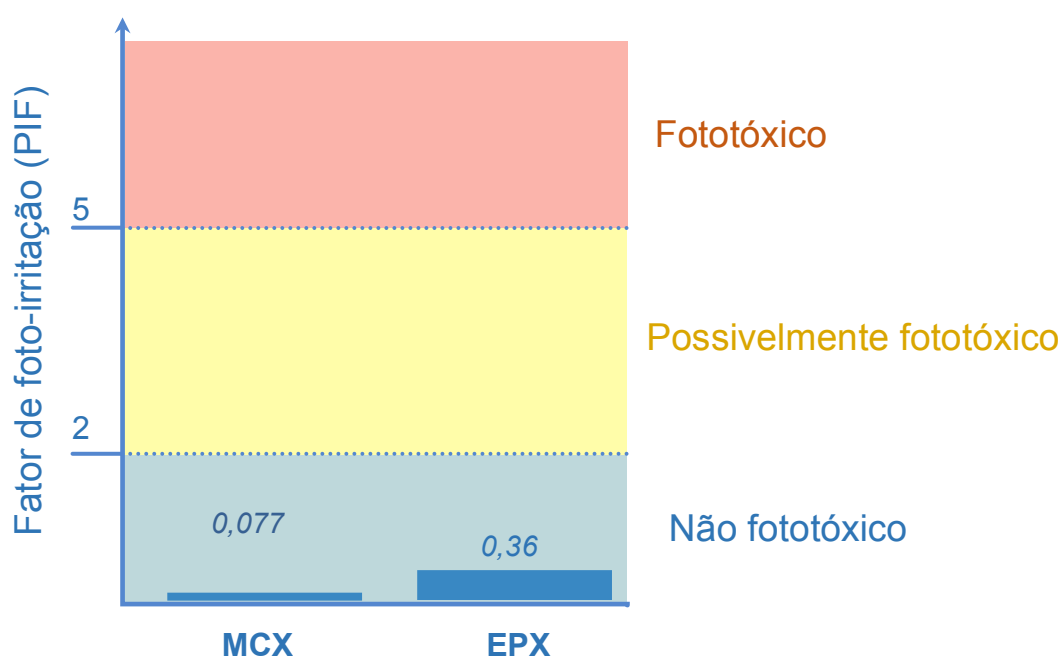


Figura 27. Resultado do fator de fotoirritação das moléculas derivadas de xilitol

Os resultados de fototoxicidade, negativos para ambos os compostos derivados de xilitol, apresentados neste trabalho são de grande importância, especialmente para aplicação cosmética, pois as formulações tópicas são comumente usadas durante o dia e envolvem a exposição ao sol. De acordo com os pareceres de segurança do CIR (Cosmetics Ingredient Review, EUA), conservantes utilizados em produtos para a pele, tais como Fenoxietanol, DMDM Hidantoína, Benzoato de Sódio, IPBC, e também substâncias com ação conservante, Caprililglicol e Pentilenoglicol, apresentaram resultados negativos na avaliação de fototoxicidade (39-40, 55, 66).

5.1.4. Potencial irritativo *in vitro*

5.1.4.1. Avaliação da irritação ocular - HET-CAM (Teste da membrana corioalantóide do ovo de galinha)

O HET-CAM é um método alternativo para avaliação do potencial irritante ocular que utiliza ovos de galinha embrionados a fim de avaliar o grau de irritação de mucosas, sendo que seu uso como método alternativo ao teste de irritação ocular em coelhos é estudado desde 1988. Este é um dos ensaios de triagem recomendados pela agência de proteção ambiental dos EUA (EPA) para a identificação de irritantes severos e com potencial corrosivo ocular. A avaliação do potencial de irritação é essencial para determinar a segurança e o uso de alguns compostos cosméticos resultam em dermatites de contato. Neste teste, aplica-se o produto diretamente na membrana corioalantóide, sem que haja nenhuma barreira protetora neste tipo de exposição. Desta maneira, a maioria das substâncias com ação conservante apresenta resultado positivo neste ensaio. Entretanto, este tipo de teste é muito sensível e estudos demonstraram a alta incidência de falsos positivos. Neste sentido, os resultados devem ser avaliados cuidadosamente para a composição da caracterização do risco dos compostos (147).

A irritação da membrana mucosa é avaliada através da determinação da irritação ocular após o contato único com compostos cosméticos. Os testes para avaliar este parâmetro baseiam-se no fato de que algumas substâncias podem causar vermelhidão, edema conjuntival e opacidade da córnea (148).

No Apêndice 6 encontram-se os resultados da pontuação média obtida entre 4 ovos, para o ensaio realizado utilizando as moléculas derivadas de xilitol. Esses valores foram obtidos comparando os fenômenos observados com a graduação contida na tabela 7, na qual estão descritos os níveis de avaliação para cada um dos fenômenos observados.

Neste trabalho, a classificação obtida neste ensaio sugere que Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol apresentam potencial irritante (Figura 28). Este resultado contribui para o esperado para compostos com atividades conservante.

Fenoxietanol, parabenos e IPBC são exemplos de substâncias que podem ser responsáveis tanto por irritação cutânea quanto ocular. Outros agentes antimicrobianos, tais como as isotiazolinonas e piritionato de zinco e sódio, são irritantes. Entretanto, eles são necessários em produtos para uso tópico devido a sua ação conservante.

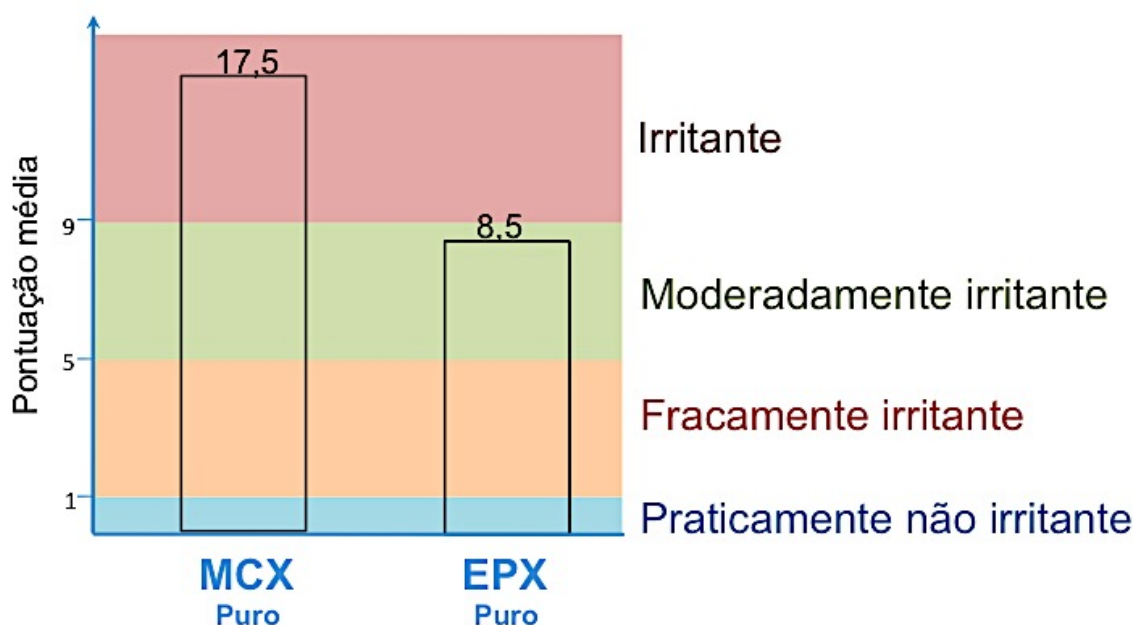


Figura 28. Classificação do potencial irritativo no teste de HET-CAM

5.1.4.2. Avaliação da irritação ocular - BCOP (*Bovine Corneal Opacity and Permeability Test*)

Complementar ao teste de HET-CAM foi realizado e, em função do resultado de irritação do Monoéster de C-8 Xilitol puro, foi realizado o teste de BCOP, com o composto diluído a 10%.

O resultado obtido encontra-se na figura 29.

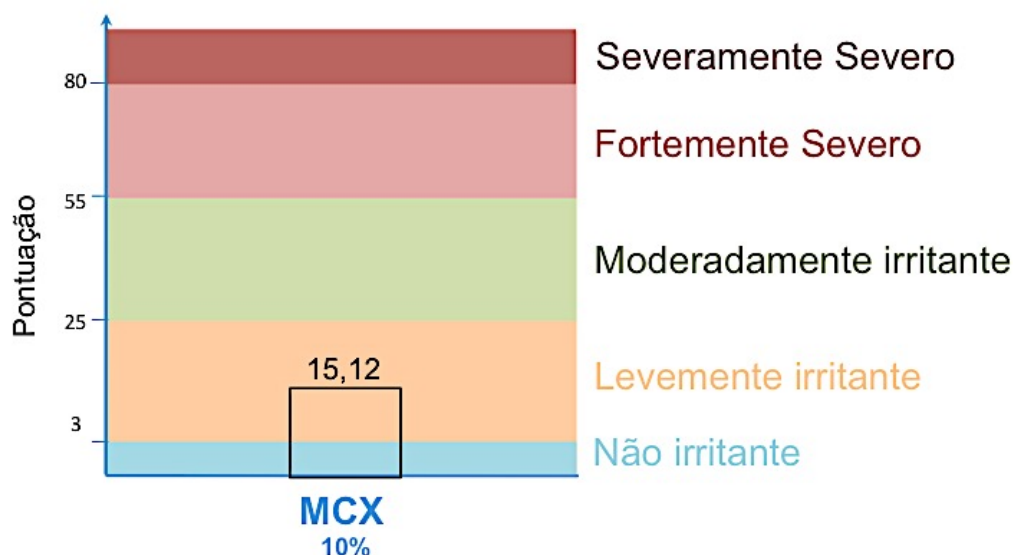


Figura 29. Classificação do potencial irritativo no teste de BCOP

O composto derivado de xilitol a 10% foi classificado como levemente irritante no teste de BCOP. Este resultado contribui para a avaliação da concentração de uso da molécula derivada de xilitol a ser indicada em produtos tópicos, ou seja, nossos resultados sugerem que o Monoéster de C-8 Xilitol seja utilizado em concentração inferior a esta estudada.

5.1.5. Potencial mutagênico *in vitro*

Adicionalmente aos efeitos relacionados à pele, percebe-se que há uma preocupação crescente associada à câncer decorrente do uso de produtos. Tanto Ésteres de Fosfato de Xilitol quanto Monoéster de C-8 Xilitol foram avaliados quanto ao potencial mutagênico através do teste de AMES e os dados obtidos encontram-se no Apêndice 5.

Uma vez que o teste de Ames é uma metodologia validada e recomendada pela OECD para avaliação toxicológica de agentes químicos, esta foi realizada para verificar se as moléculas derivadas de xilitol induziriam efeito mutagênico até a concentração máxima testada. Ésteres de Fosfato de Xilitol e Monoéster de C-8 Xilitol não induziram mutagenicidade nas cepas testadas, com e sem metabolização (Tabela 32). Entretanto, outros estudos *in vitro* são indicados a fim de compor os testes necessários para afirmar a segurança dos compostos

quanto à carcinogenicidade e genotoxicidade. O teste de micronúcleo e o teste de aberração cromossômica podem ser realizados para que a avaliação do perigo das moléculas seja completa.

Tabela 32. Classificação em função do índice mutagênico

Cepas	Índice mutagênico			Mutagênico
	Mutagênico provável	Ésteres de Xilitol Fosfato	Monoéster de C8 Xilitol	
TA 97	<0,5	0,92 - 1,18	0,90 - 1,01	>2,0
TA 98		0,82 - 1,05	0,47 - 0,98	
TA100		0,90 - 1,13	1,10 - 1,47	
TA102		0,94 - 1,03	1,16 - 1,40	
TA1535		0,65 - 1,38	0,60 - 1,53	

5.1.6. Biodegradabilidade imediata *in vitro*

No teste *in vitro* de biodegradabilidade realizado neste trabalho, a simulação laboratorial das condições ambientais permitiu avaliar a suscetibilidade de compostos à metabolização por microrganismos presentes no meio ambiente. Para que a substância teste fosse considerada facilmente biodegradável, um mínimo de 60% de degradação deveria ser alcançado em 10 dias, contados a partir dos 10% de biodegradação, sendo que a janela de 10 dias deveria acabar em 28 dias. Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 30 e 31.

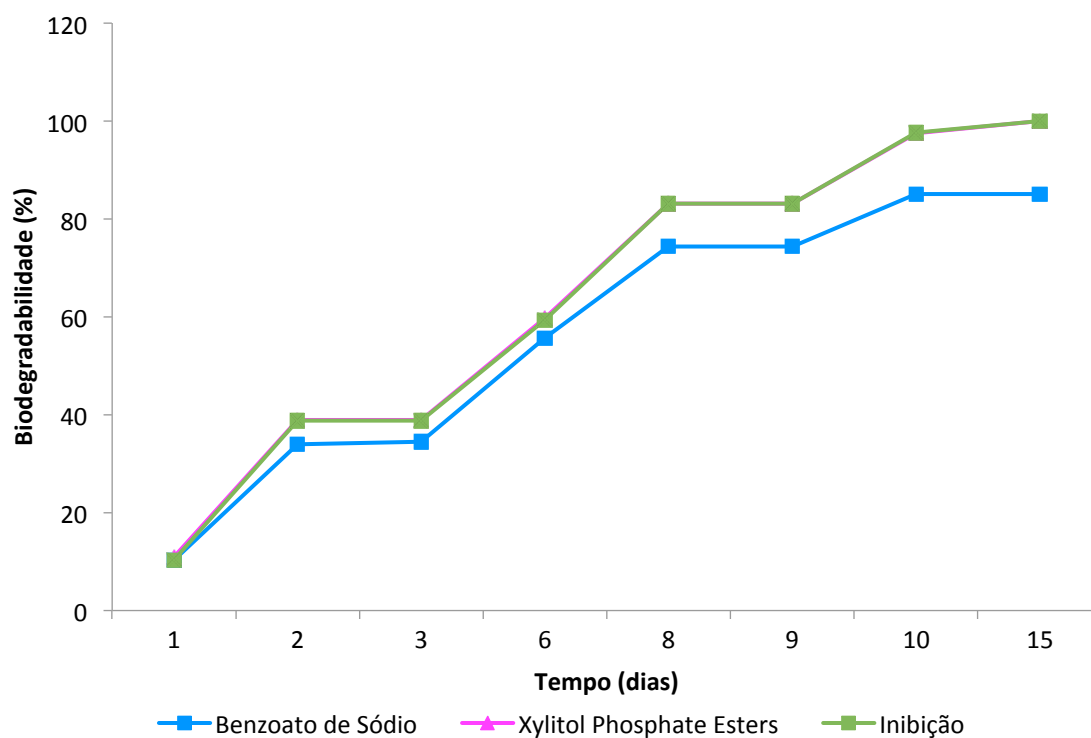


Figura 30: Porcentagem de CO₂ liberado nas soluções em função do período de incubação em dias para os Ésteres de Fosfato de Xilitol

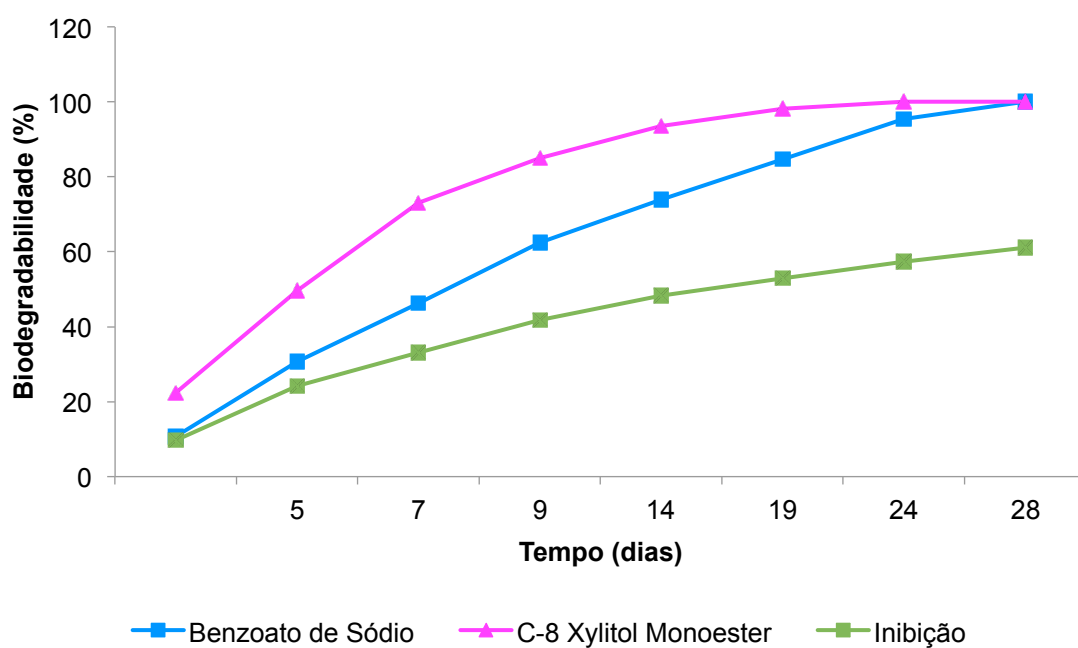


Figura 31: Porcentagem de CO₂ liberado nas soluções em função do período de incubação em dias para o Monoéster de C-8 Xilitol

Conforme dados obtidos (Apêndice 4), ambas as moléculas demonstraram ser facilmente degradáveis. De acordo com a metodologia empregada e nas condições experimentais do ensaio, ambas as moléculas derivadas de xilitol apresentaram biodegradação de 100% medido em CO₂ liberado durante o período de 28 dias. Portanto, os testes foram considerados válidos, pois a diferença entre os extremos nas duplicatas foi menor do que 20% no momento em que a amostra demonstrou um platô e/ou não se observou mais a evolução de CO₂, no final do teste ou após a janela de 10 dias de incubação. Para o teste com Ésteres de Fosfato de Xilitol, o padrão biodegradável apresentou 85,06% de biodegradação, tendo atingido 60% de evolução de CO₂ em 10 dias contados a partir do momento em que se observou 10% de evolução de CO₂ e não excedeu o período máximo de 14 dias. A inibição apresentou 96,91% de biodegradação, tendo sido atingido os 25% de liberação de CO₂ em 14 dias, ou seja, a substância teste não foi considerada inibitória aos microrganismos. Para o teste com Monoéster de C-8 Xilitol, o padrão biodegradável apresentou 100% de biodegradação, tendo atingido 60% de evolução de CO₂ em 10 dias contados a partir do momento em que se observou 10% de evolução de CO₂ e não excedeu o período máximo de 14 dias. A inibição apresentou 61,04% de biodegradação, tendo sido atingido os 25% de liberação de CO₂ em 14 dias.

5.2. Estudos clínicos de segurança

5.2.1. Compatibilidade cutânea

Foram considerados, para a verificação da compatibilidade cutânea de uma solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol e de uma loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol, 10 participantes de pesquisa incluídos para cada produto e que foram objeto de 9 aplicações do produto teste e do produto placebo (solução sem Ésteres de Fosfato de Xilitol ou sem Monoéster de C-8 Xilitol), sendo 5 aplicações no laboratório e 4 aplicações em domicílio.

Nenhum participante de pesquisa relatou sensações de desconforto e, no exame clínico, nenhum sinal foi verificado pelo médico dermatologista tanto na área em que foram aplicadas as formulações solução contendo as moléculas derivadas

de xilitol quanto na área em que foi aplicado o produto sem o composto derivado de xilitol.

Considerando que a classificação da compatibilidade é baseada em porcentagem de participantes reativos e nenhum deles apresentou sensações de desconforto e nenhum apresentou sinais clínicos, concluímos que as formulações contendo moléculas derivadas de xilitol podem ser consideradas como tendo uma compatibilidade cutânea muito boa, conforme a classificação constante da Tabela 20.

Desta forma, pode-se considerar que as moléculas derivadas de xilitol nas concentrações testadas são compatíveis com a pele, não ocasionando reações inflamatórias, e podem ser utilizadas em produtos de uso tópico.

5.2.2. Potencial alergênico

Foram considerados, para a verificação do potencial alergênico de uma solução contendo 3% de ésteres de fosfato de xilitol e de uma loção hidratante contendo 1,5% de monoéster de c-8 xilitol, 55 participantes de pesquisa, nos quais os produtos foram aplicados sob adesivos.

Nenhuma reação cutânea foi verificada pelo médico dermatologista durante todo o período do estudo.

Considerando a classificação do ICDRG, concluímos que as formulações contendo moléculas derivadas de xilitol não induziram alergenidade nos participantes de pesquisa durante o estudo.

A avaliação deste parâmetro é muito importante para compostos com atividade conservante visto que a alergia é o parâmetro de preocupação mais frequentemente observado em substâncias que apresentam esta função. Desta maneira, o resultado deste estudo indica que as moléculas derivadas de xilitol nas concentrações testadas não são capazes de induzir o potencial alergênico e podem ser utilizadas em cosméticos.

5.2.3. Aceitabilidade cutânea e ocular

Os dados de aceitabilidade cutânea e ocular encontram-se nos Apêndices 7 e 8.

5.2.3.1. Aceitabilidade cutânea de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

O ensaio de aceitabilidade é aquele que possibilita a avaliação de cosméticos conforme as condições normais de uso.

Foram considerados para a verificação da aceitabilidade do bálsamo pós-barba 31 participantes de pesquisa incluídos que foram objeto de no mínimo um exame pós-aplicação, na data prevista ou em outra previamente agendada. Durante o estudo, quatro participantes (13%) relataram sensações de desconforto com o uso do produto teste, como ardência leve na área da barba, prurido moderado e intenso na área da barba e ressecamento leve na face. Estas manifestações duraram de 1 a 2 dias, sendo que estas reações não impediram a continuidade no estudo e só foram informadas na última visita.

No exame clínico, nenhum sinal foi verificado pelo médico dermatologista.

Considerando que a classificação da aceitabilidade é baseada em porcentagem de participantes reativos e que no total 13% deles apresentaram sensações de desconforto e nenhum apresentou sinais clínicos, concluímos que o bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol pode ser considerado como tendo uma boa aceitabilidade cutânea por apresentar menos de 25% do painel de participantes reativos, conforme a classificação constante da tabela 23.

5.2.3.2. Aceitabilidade cutânea e ocular de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Foram considerados para a verificação da aceitabilidade da loção tônica facial 32 participantes de pesquisa incluídos que foram objeto de no mínimo um exame pós-aplicação, na data prevista ou em outra previamente agendada. Durante o estudo, dois participantes (6%) relataram sensações de desconforto com o uso do

produto teste, como ardência leve e prurido leve na face. Estas manifestações duraram de 2 a 3 dias, sendo que estas reações não impediram a continuidade no estudo e só foram informadas na última visita.

No exame clínico, nenhum sinal foi verificado pelo médico dermatologista.

Considerando que a classificação da aceitabilidade é baseada em porcentagem de participantes reativos e que no total 6% deles apresentaram sensações de desconforto e nenhum apresentou sinais clínicos, concluímos que a loção tônica facial contendo 3% de ésteres de fosfato de xilitol pode ser considerado como tendo uma boa aceitabilidade cutânea por apresentar menos de 25% do painel de participantes reativos, conforme a classificação constante da tabela 23.

Os mesmos participantes de pesquisa incluídos no estudo de aceitabilidade cutânea também tiveram avaliação da aceitabilidade ocular. Durante o estudo de avaliação da aceitabilidade ocular do produto teste, 1 dos 32 participantes avaliados, apresentaram sensações de desconforto relacionados ao uso do produto. Este referiu ardência ocular de intensidade leve. Esta manifestação durou 2 dias, entretanto esta reação não impediu a continuidade no estudo e só foi informada na última visita. Além disso, com o termino do estudo, não foi observado qualquer sinal clínico relacionado ao uso do produto. Os demais participantes não apresentaram sinais clínicos ou sensações de desconforto relacionados ao uso do produto.

Considerando que a classificação da aceitabilidade é baseada em porcentagem de participantes reativos e que no total 3% apresentou sensações de desconforto e nenhum apresentou sinais clínicos, concluímos que a loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol pode ser considerado como tendo uma boa aceitabilidade ocular por apresentar menos de 25% do painel de voluntárias reativas, conforme a classificação constante da tabela 22.

5.3.2.3. Aceitabilidade cutânea e ocular de uma loção tônica capilar e um shampoo contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Foram considerados para a verificação da aceitabilidade do shampoo em conjunto com a loção tônica capilar 33 participantes de pesquisa incluídos que foram objeto de no mínimo um exame pós-aplicação, na data prevista ou em outra previamente agendada. Durante o estudo, dois participantes (6%) relataram

sensações de desconforto com o uso do produto teste, como prurido leve e intenso e descamação leve no couro cabeludo. Estas manifestações duraram de 1 a 8 dias, sendo que estas reações não impediram a continuidade no estudo e só foram informadas na última visita.

No exame clínico, eritema e inflamação foram detectados pelo médico dermatologista em um dos participantes de pesquisa (3%).

Considerando que a classificação da aceitabilidade é baseada em porcentagem de participantes reativos e que no total 6% deles apresentaram sensações de desconforto e 3% apresentou sinais clínicos, concluímos que a loção tônica facial contendo 3% de ésteres de fosfato de xilitol pode ser considerado como tendo uma aceitabilidade cutânea moderada, conforme a classificação constante da tabela 23.

Os mesmos participantes de pesquisa incluídos no estudo de aceitabilidade cutânea também tiveram avaliação da aceitabilidade ocular. Durante o estudo de avaliação da aceitabilidade ocular dos produtos testados, nenhum dos 33 participantes avaliados apresentou sensações de desconforto relacionados ao uso do produto. Além disso, com o término do estudo, não foi observado qualquer sinal clínico relacionado ao uso dos produtos.

Considerando que a classificação da aceitabilidade é baseada em porcentagem de participantes reativos e que nenhum apresentou sensações de desconforto e nenhum apresentou sinais clínicos, concluímos que a loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol pode ser considerado como tendo uma aceitabilidade ocular muito boa, conforme a classificação constante da 23.

5.3. Estudos clínicos de multifuncionalidade

Os dados das medidas objetivas encontram-se nos Apêndices 10 a 13.

5.3.1. Manutenção da hidratação

5.3.1.1. Teste de TEWL de uma loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol

O Monoéster de C-8 Xilitol em uma preparação cosmética teve seu efeito

na redução da perda de água transepidermica avaliado, o qual é importante em produtos tópicos.

Após 7 dias de aplicação das formulações objeto de estudo nas regiões dos antebraços dos participantes foi possível observar que apenas para a formulação contendo Monoéster C-8 Xilitol houve diminuição significativa da perda de água transepidermica. Para a região controle sem produto e para a região onde foi aplicada a loção hidratante sem o composto derivado de xilitol (placebo) não houve alteração significativa dos valores de TEWL após 7 dias (Figura 32).

Portanto, a formulação contendo Monoéster C-8 Xilitol se mostrou eficaz após 7 dias de uso reduzindo a perda de água transepidermica quando comparado com os valores basais enquanto que o placebo não provocou alteração nestes valores. Isto sugere que após a aplicação do produto houve efeito na função barreira da pele.

Embora os resultados sejam estatisticamente significativos, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de verificar a relevância clínica dos dados obtidos. Neste sentido, o potencial efeito na hidratação foi verificado através do método Raman. Embora o resultado tenha se mostrado favorável, estudos adicionais devem ser realizados para a comprovação deste benefício.

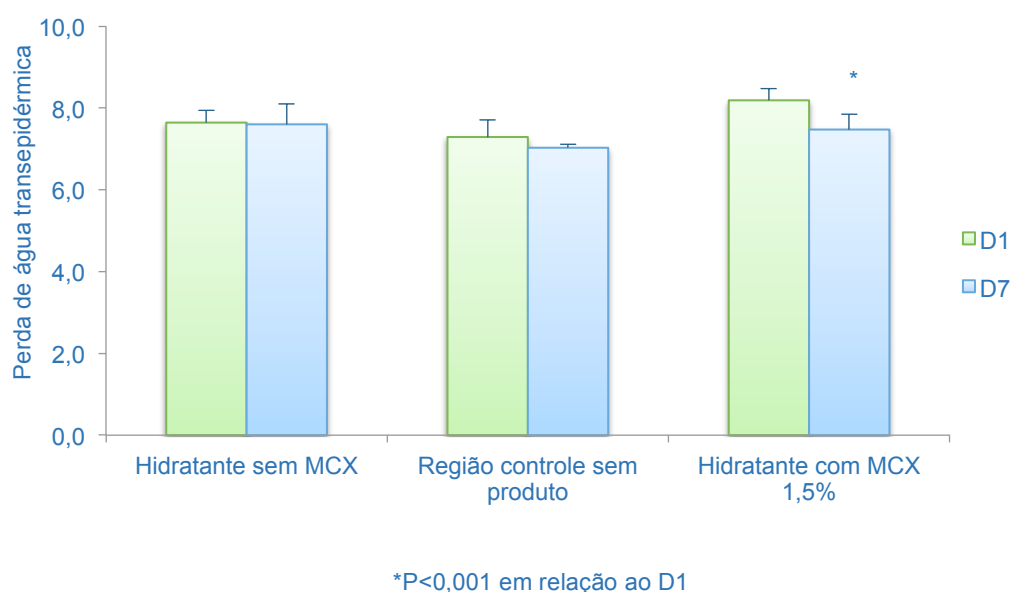


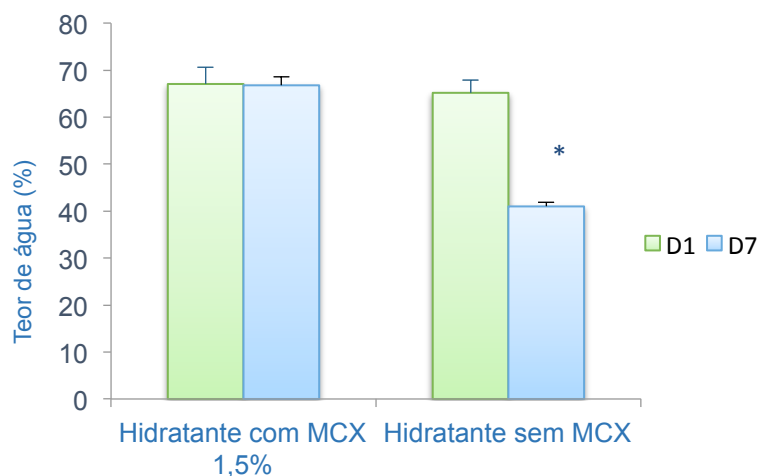
Figura 32: Efeito na perda de água transepidermica (TEWL) após 7 dias de aplicação de uma loção hidratante com e sem 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol (n=4)

5.3.1.2. Avaliação do efeito potencial na hidratação da pele de uma loção hidratante contendo 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol através do método Raman

Para o estudo de avaliação do efeito potencial na hidratação foi considerado um participante de pesquisa, totalizando 10 sítios de medida para cada condição (loção hidratante com 1,5% de Monoéster de C-8 Xilitol e loção hidratante sem a molécula derivada de xilitol).

No primeiro dia de avaliação, tanto a formulação placebo quanto a com Monoéster de C-8 Xilitol apresentaram comportamento semelhante em relação ao aumento do teor de água na pele após 1h da aplicação. Após 7 dias de uso das formulações nas regiões dos antebraços foi possível observar que apenas para a formulação contendo Monoéster C-8 Xilitol o teor de água foi mantido. (Figura 33).

Este resultado encoraja estudos mais aprofundados para verificação do efeito hidratante de formulações com Monoéster de C-8 Xilitol.



*P<0,001 em relação ao D1

Figura 33: Perfil hídrico das camadas da pele após aplicação de solução hidratante com e sem Monoéster de C-8 Xilitol (n=1)

5.3.2. Atividade desodorante

Apesar do fato de que a secreção axilar não possui odor, as bactérias que

residem nas axilas transformam esta secreção em moléculas voláteis odoríferas (140).

No estudo, onde o efeito desodorante de uma solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol foi comparado ao efeito de uma solução contendo 3% de uma substância desodorante de mercado (Triclosan), foram considerados 14 participantes de pesquisa.

Após 4 aplicações dos produtos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o efeito dos produtos após 8h e 24h (Figura 34).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol possui efeito desodorante compatível com a solução contendo 3% de Triclosan.

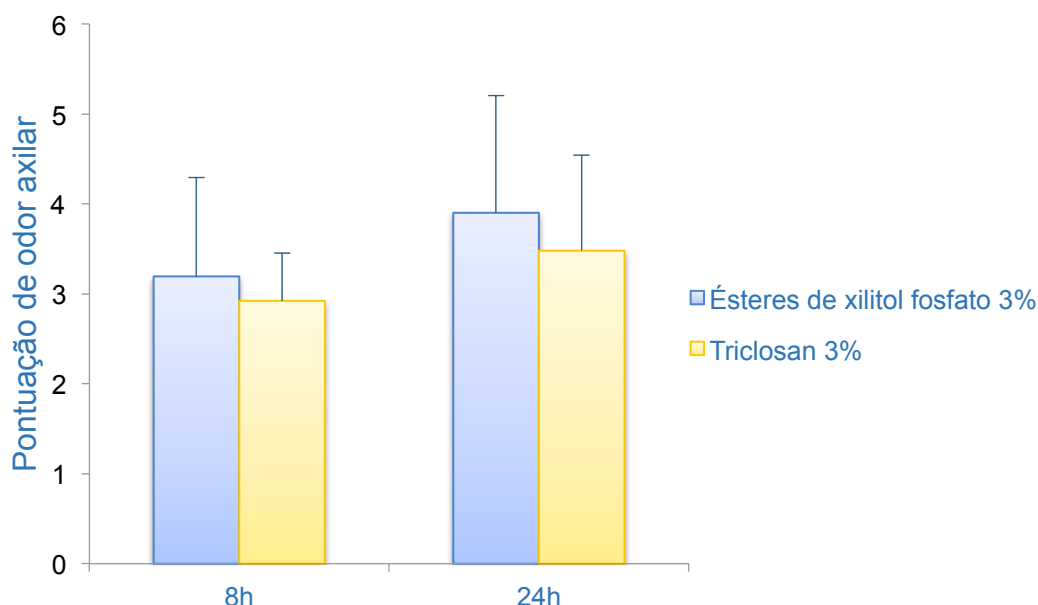


Figura 34: Comparação do efeito desodorante de uma solução contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol com uma solução contendo 3% de Triclosan (n=14)

5.3.3. Redução de oleosidade

A multifuncionalidade dos compostos foi avaliada através de métodos biofísicos, os quais permitem a realização de avaliações nas condições reais de uso do produto.

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária),

quando é atribuído um benefício específico a um produto, é necessária a comprovação de sua eficácia. Sendo assim, os métodos biofísicos têm ocupado uma posição de destaque para a avaliação de produtos, pois consistem na determinação de características biológicas, mecânicas e funcionais da pele por meio de métodos objetivos e não invasivos (95).

Assim, avaliamos o efeito de formulações contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol na redução da oleosidade tanto da face quanto do couro cabeludo

Os resultados obtidos na avaliação da oleosidade mostraram que houve redução significativa após 28 dias de uso de formulações contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol.

Na avaliação do shampoo e tônico capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol, a maioria dos participantes sentiu-se satisfeita e percebeu melhora em atributos relacionados a oleosidade e redução de caspa. Entretanto, a queda capilar não foi percebida pela maior parte das pessoas que utilizou os produtos. Além disso, a loção facial com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol também foi apreciada pelos participantes de pesquisa, sendo que os atributos de oleosidade e hidratação foram os que apresentaram melhor desempenho. Em relação ao bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol, de acordo com os participantes, este produto foi bem avaliado tanto após 14 quanto após 28 dias de uso.

5.3.3.1. Oleosidade da pele após o uso de formulações contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

A acne é um processo de origem multifatorial, no qual a bactéria *Propionibacterium acnes* auxilia na ocorrência do quadro inflamatório (149). A caspa ocorre em áreas ricas em glândulas sebáceas com envolvimento de espécies de *Malassezia* (150).

Os resultados foram expressos em termos da variação entre o primeiro dia do estudo (D1) e o último dia de utilização de produto teste (D28) em relação à oleosidade da pele para cada um dos participantes de pesquisa (figura 35 a 37).

Para todos os grupos com as formulações com ésteres de fosfato de xilitol, observa-se redução na oleosidade dos participantes após 28 dias de uso de produto teste.

Para o grupo controle, não houve variação estatisticamente significativa na oleosidade da pele ($p=0,6497$) (Figura 38).

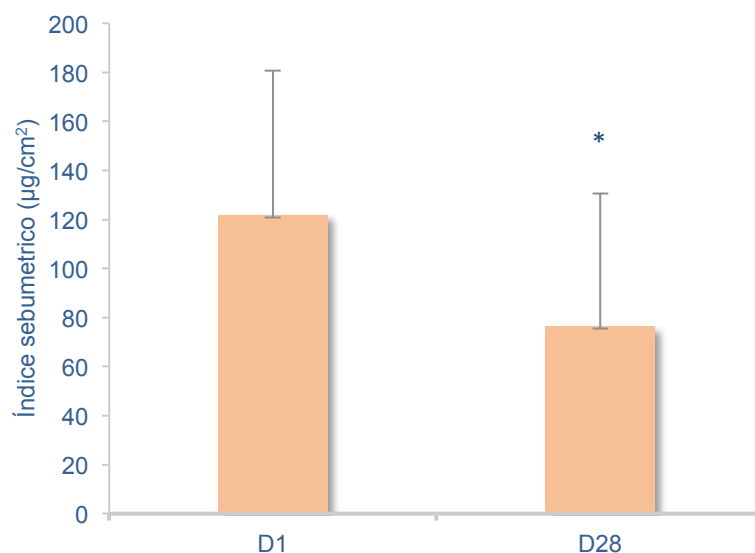


Figura 35: Efeito na oleosidade da pele durante 28 dias após o uso de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol ($n=20$)

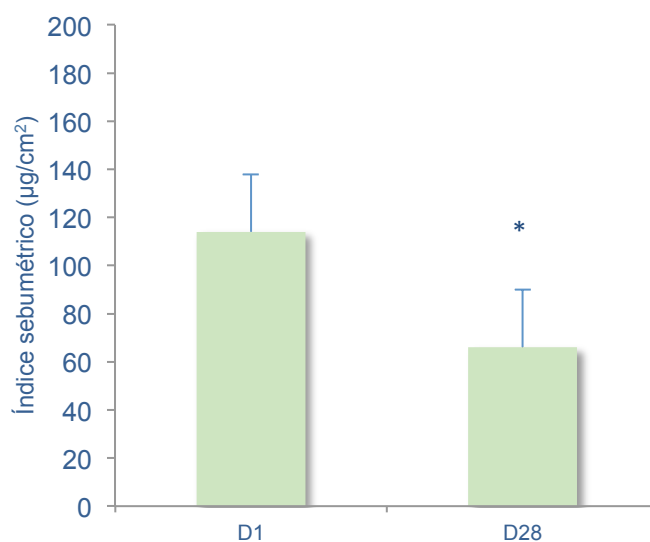


Figura 36: Efeito na oleosidade durante 28 dias após o uso de um tônico facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol ($n=19$)

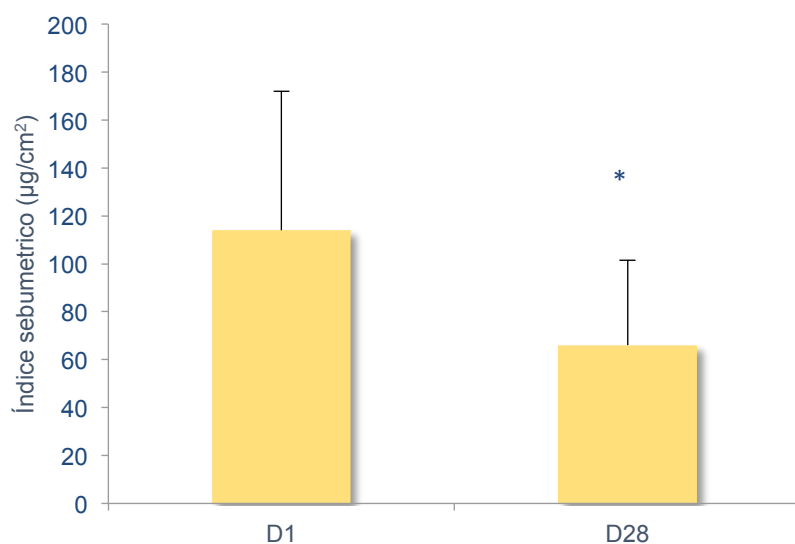


Figura 37: Efeito na oleosidade da pele durante 28 dias após o uso de um shampoo e um tônico capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=14)

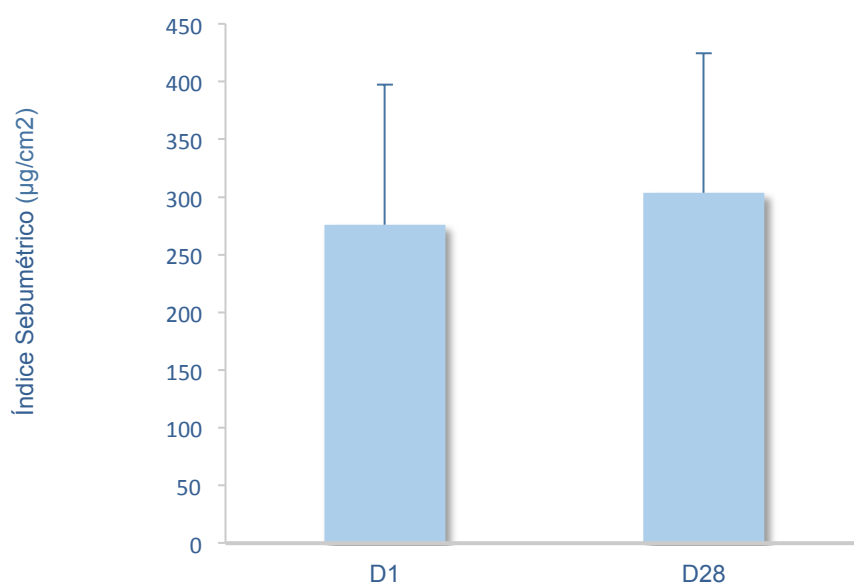


Figura 38: Efeito na oleosidade da pele do grupo controle (n=14)

5.3.4. Apreciabilidade Cosmética

Os dados de apreciação estão no Apêndice 9.

5.3.4.1. Apreciabilidade Cosmética de produtos contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Complementando os estudos para avaliação da multifuncionalidade, foram realizadas avaliações de apreciação cosmética. Neste tipo de pesquisa, os participantes opinam sobre o produto utilizado e a condição de sua pele após o uso. Este tipo de análise tem grande importância no desenvolvimento de um produto, pois a aceitação do consumidor pode influenciar de maneira importante na escolha do cosmético. Neste sentido, este estudo pode contribuir para o sucesso de uma formulação no mercado (151, 152).

5.3.4.2. Apreciabilidade Cosmética de um shampoo e uma loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Foram considerados, para a verificação da apreciação cosmética do shampoo e da loção tônica capilar contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol, 31 participantes.

Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de respostas positivas (sim) na opinião dos participantes de pesquisa.

Quanto à apreciação das qualidades cosméticas dos produtos em estudo, a maioria dos participantes de pesquisa apontaram resultados positivos na melhora dos parâmetros avaliados.

Em relação ao grau de satisfação dos participantes de pesquisa em relação ao uso por 28 dias do shampoo e da loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol, 12,9% declararam baixa satisfação com o uso dos produtos, 48,4% declararam satisfação moderada e 38,7% afirmaram ter alta satisfação com os produtos.

Portanto, o shampoo e a loção tônica capilar com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol tiveram sua apreciabilidade cosmética classificada como boa segundo os participantes da pesquisa.

5.3.4.3. Apreciabilidade Cosmética de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Foram considerados, para a verificação da apreciabilidade cosmética da loção tônica facial contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol, 32 participantes.

Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de respostas positivas (sim) na opinião dos participantes de pesquisa.

Quanto à apreciação das qualidades cosméticas do produto em estudo, a maioria dos participantes de pesquisa apontaram resultados positivos na melhora dos parâmetros avaliados.

Em relação ao grau de satisfação dos participantes de pesquisa em relação ao uso por 28 dias da loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol, 9% declararam baixa satisfação com o uso dos produtos, 75% declararam satisfação moderada e 16% afirmaram ter alta satisfação com os produtos.

Portanto, a loção tônica facial com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol teve sua apreciabilidade cosmética classificada como boa segundo os participantes da pesquisa.

5.3.4.4. Apreciabilidade Cosmética de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Foram considerados, para a verificação da apreciabilidade cosmética do bálsamo pós-barba contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol, 31 participantes.

Os resultados foram expressos na forma de porcentagem de respostas positivas (sim) na opinião dos participantes de pesquisa.

Quanto à apreciação das qualidades cosméticas do produto em estudo, a maioria dos participantes de pesquisa apontaram resultados positivos na melhora dos parâmetros avaliados.

Em relação ao grau de satisfação dos participantes de pesquisa em relação ao uso por 14 dias do bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol, 13% declararam baixa satisfação com o uso dos produtos, 54% declararam satisfação moderada e 32% afirmaram ter alta satisfação com os produtos. Após 28 dias de uso, 10% declararam baixa satisfação com o uso dos produtos, 52% declararam satisfação moderada e 39% afirmaram ter alta satisfação com os produtos



Portanto, o bálsamo pós-barba com 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol teve sua apreciabilidade cosmética classificada como boa segundo os participantes da pesquisa.

6. CONCLUSÃO

As moléculas derivadas de xilitol (Monoéster de C-8 Xilitol e Ésteres de Fosfato de Xilitol) apresentaram-se promissoras para utilização como conservantes em produtos cosméticos pois apresentaram perfil toxicológico satisfatório compatível com a aplicação tópica de substâncias com atividade conservante, conforme tabela 33.

Tabela 33: Conclusões dos resultados dos ensaios

Parâmetros Avaliados			Resultados
Toxicidade	Pré-clínicos	Segurança – <i>in silico</i>	✓
		Toxicidade	⚠
		Fototoxicidade	✓
		Biodegradação	✓
		Mutagenicidade	✓
		Potencial irritativo	⚠
	Clínico	Compatibilidade cutânea	✓
		Potencial alergênico	✓
		Aceitabilidade cutânea e ocular	✓
Multi funcionalidade	Clínico	Manutenção da hidratação	✓
		Atividade desodorante	✓
		Redução da oleosidade	✓

 - satisfatório,
  - pontos de atenção

Na avaliação de segurança *in silico*, os compostos isoladamente apresentaram resultados negativos para mutagenicidade, sensibilização, irritação e potencial de permeação ($\text{LogKoW} < 1$ e > 4) e positivos para biodegradabilidade imediata. Adicionalmente, a comparação das moléculas derivadas de xilitol com

substâncias com ação conservantes utilizadas no mercado corroboram para a segurança do Monoéster de C-8 Xilitol e dos Ésteres de Fosfato de Xilitol. Embora a utilização de modelos computacionais para predição toxicológica apresente vantagens, sendo uma metodologia rápida e de baixo custo, para a avaliação de compostos cosméticos, é importante conhecer suas limitações, pois muitas ferramentas ainda estão em desenvolvimento e validação, para direcionar os estudos experimentais.

Nos estudos pré-clínicos para avaliação da segurança *in vitro*, nossos resultados demonstraram que as moléculas derivadas de xilitol não são fototóxicas ou mutagênicas e são prontamente biodegradáveis. Entretanto, os dados do teste de citotoxicidade sugerem toxicidade moderada para o Monoéster de C-8 Xilitol e toxicidade baixa para os Ésteres de Fosfato de Xilitol. Ambos os compostos, quando testados puros, apresentaram potencial irritativo, sendo mais baixo para os Ésteres de Fosfato de Xilitol (classificado como moderado) e mais alto para o Monoéster de C-8 Xilitol, sendo que este mostrou-se fracamente irritante quando testado a 10%. Estes resultados se devem provavelmente à atividade conservante dos derivados de xilitol, por serem moléculas biologicamente ativas. Entretanto, é importante ressaltar que as metodologias realizadas para avaliação destes parâmetros apresentam alta sensibilidade.

Na avaliação clínica de segurança, nos estudos de compatibilidade cutânea e potencial alergênico, os compostos derivados de xilitol não ocasionaram reações adversas, sinais clínicos ou sensações de desconforto, nos participantes. Desta forma, a compatibilidade cutânea foi classificada como muito boa e, conforme nossos resultados, os compostos derivados de xilitol não são alergênicos. Os estudos de aceitabilidade cutânea e ocular realizados com as formulações contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol também demonstraram que estes compostos são bem aceitos (tolerados) pela pele, sendo que as sensações de desconforto observadas nos participantes foram de caráter leve e transiente e somente um participante apresentou sinal clínico com a utilização das formulações capilares anti-caspa.

Em relação aos estudos clínicos para avaliação da multifuncionalidade, nosso resultados sugerem que as formulações contendo Monoéster de C-8 Xilitol melhoram a barreira cutânea e mantêm quantidade de água na epiderme e que as formulações contendo Ésteres de Fosfato de Xilitol apresentam atividade

desodorante quando comparada com o Triclosan, um composto amplamente utilizado no mercado cosmético, com a vantagem de não ser nocivo ao meio ambiente e melhoram a oleosidade da pele.

Portanto, nossos resultados evidenciam a segurança dos conservantes derivados de xilitol, comprovando o potencial de aplicação em formulações cosméticas devido ao perfil toxicológico e à multifuncionalidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lundov MD, Moesby L, Zachariae C, Johansen JD. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*. 2009; 60: 70–78
2. Amaral LF, Camilo NS, Pereda MD, Levy CE, Moriel P, Mazzola PG. Evaluation of antimicrobial effectiveness of C-8 xylitol monoester as an alternative preservative for cosmetic products. *Int J Cosmet Sci*. 2011; 33(5), 391-397.
3. Morse LJ, Williams HL, Grenn Jr FP, Eldrige EE, Rotta JR. Septicemia due to *Klebsiella pneumoniae* originating from a hand-cream dispenser. *New Eng J Med*. 1967; 277: 472-473.
4. Reid FR, Wood TO. *Pseudomonas* corneal ulcer: the causative role of contaminated eye cosmetics. *Arch Ophthalmol*. 1979; 97: 1640-1641.
5. Taub SJ. Contaminated cosmetic as cause of eye infections. *Eye ear nose throat mon*. 1975; 54 (2): 81-82.
6. Varvaresou A, Papageorgiou S, Tsirivas E, Protopapa E, Kintziou H, Kefala V, Demetzos C. Self-preserving cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*. 2009; 31: 163–175.
7. Hugbo PG, Onyekweli AO, Igwe I. Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. December 2003; 2 (2): 229-234.
8. Sasseville D. Hypersensitivity to preservatives. *Dermatol Ther*. 2004; 17: 251-263.
9. Jong CT, Stathan BN, Green CM et al. Contact sensitivity to preservatives in the UK, 2004-2005: results of multicentre study. *Cont Derm*. 2007; 57: 165-168.
10. Lee E, An S, Choi D, Moon S, Chang I. Comparison of objective and sensory skin irritations of several cosmetic preservatives. *Cont Derm*. 2007; 56: 131- 136.
11. Boyvat A, Akyol A, Gurgey E. Contact sensitivity to preservatives in Turkey. *Cont Derm*. 2005; 52: 329-332.

12. Flyvholm MA. Preservatives in registered chemical products. *Cont Derm.* 2005; 53: 27-32.
13. Hasan T, Rantanen T, Alanko K. et al. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995-1997 and 2000-2002 in Finland – a multicentre study. *Cont Derm.* 2005; 53: 40-45.
14. Wilkinson JD, Shaw S, Andersen KE, Brandao FM, Bruynzeel DP, Bruze M, Camarasa JM, Diepgen TL, Ducombs G, Frosch PJ, Goossens A, Lachappelle JM, Lahti A, Menné T, Seidenari S, Tosti A, Wahlberg JE. Monitoring levels of preservative sensitivity in Europe. *Contact Dermatitis.* 2002 Apr;46(4):207-10.
15. Chapman JS, Siehl MA, Fearnside KB. Preservative tolerance and resistance. *Int J Cosm Sci.* 1998; 20: 31-39.
16. Schnuch A, Geier J, Uter W, Frosch PJ. Patch testing with preservatives antimicrobials and industrial biocides. Results from a multicenter study. *Brit J Dermatol.* 1998; 138: 467-476.
17. Goossens A. Contact-allergic reactions to cosmetics. *J Allergy (Cairo).* 2011, 467071.
18. Brown LH, Ronald MD, Brancaccio RR. The cosmetic clinic: cosmetics and allergies. *Skin ageing.* 2002; 10: 20-29.
19. De Groot AC, Van Joost T, Bos JD, Van der Meeren HTM, Weyland JW. Patch test reactivity to DMDM Hydantoin – relationship with formaldehyde. *Cont Derm.* 1988; 18: 197-201.
20. Hamilton T, de Gannes GC. Allergic contact dermatitis to preservatives and fragrances in cosmetics. *Skin Therapy Lett.* 2011 Apr; 16(4):1-4.
21. Maibach H, Honari G. *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects.* 1st ed. Elsevier Inc.; 2014.
22. Hartung T. Toxicology for the twenty-first century. *Nature.* 2009; 460, 208–12.
23. Rodford R. Safety evaluation of preservatives. *Int J of Cosmetic Sci.* 1997; 19 (6), 281–290.

24. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução no. 211, de 14 de julho de 2015. Definição e Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Diário Oficial da União 18 jul 2015.
25. Ashour MSE, Abdelaziz AA, El-Tayeb OM, Hefnai H. Microbial contamination of cosmetics and personal care items in Egypt. I. Contamination of toothpastes and mouthwashes J Soc Cosm Chem. 1987 Nov; 38: 435-441.
26. Ahearn DG, Sanghvi J, Haller GJ. Mascara contamination in use and laboratory studies. J. Soc Cosmet Chem. 1978 March; 29, 127-131.
27. Di Giovanni C, Arcoraci V, Gambardella L, Sautebin L. Cosmetovigilance survey: are cosmetics considered safe by consumers? Pharmacol Res. 2006 Jan;53(1):16-21.
28. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução no. 29, de 1 de junho de 2012. Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfume. Diário Oficial da União 04 jun 2012.
29. Markowetz A. New aspects in the preservation of cosmetics. Cosmetics. 2002; 128: 20-24.
30. Associação Brasileira de Cosmetologia. Guia ABC de Microbiologia – Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes. Pharmabooks Editora. 2014; 4ª Edição.p. 127-153.
31. Harris, MINC. Pele: Estrutura, Propriedade E Envelhecimento. 2ª Ed. Editora SENAC. São Paulo; 2003.
32. Yazar K, Johnsson S, Lind ML, Boman A, Lidén C. Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. Contact Dermatitis. 2010; 64, 265-272.
33. Herbert C, Rietschel RL. Formaldehyde and formaldehyde releasers: how much avoidance of cross-reacting agents is required? Contact Dermatitis. 2004 Jun;50(6):371-3.
34. Zukiewicz-Sobczak WA, Adamczuk P, Wróblewska P, Zwoliński J, Chmielewska-Badora J, Krasowska E, Galińska EM, Cholewa G, Piątek J, Koźlik J.

Allergy to selected cosmetic ingredients. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013 Oct;30(5):307-10.

35. Fransway AF. The problem of preservation in the 1990s. III. Agents with preservative function independent of formaldehyde release. *Am J Contact Dermatitis*. 1990; 1: 151.

36. Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food Chem Toxicol*. 2002 Oct;40(10):1335-73.

37. Marks JG Jr, Belsito DV, DeLeo VA, Fowler JF Jr, Fransway AF, Maibach HI, Mathias CG, Pratt MD, Rietschel RL, Sherertz EF, Storrs FJ, Taylor JS. North American Contact Dermatitis Group patch-test results, 1996-1998. *Arch Dermatol*. 2000 Feb;136(2):272-3.

38. Marks JG Jr, Belsito DV, DeLeo VA, Fowler JF Jr, Fransway AF, Maibach HI, Mathias CG, Pratt MD, Rietschel RL, Sherertz EF, Storrs FJ, Taylor JS; North American Contact Dermatitis Group. North American Contact Dermatitis Group patch-test results, 1998 to 2000. *Am J Contact Dermat*. 2003 Jun;14(2):59-62.

39. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of DMDM Hydantoin. *Journal of the American College of Toxicology*. 1988; 7 (3): 245-277

40. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Iodopropynyl Butylcarbamate. *International Journal of Toxicology*. 1998; 17 (5): 1-37.

41. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Amended Final Safety Assessment of Benzyl Alcohol, and Benzoic Acid and its Salts and Benzyl Ester. *Cosmetic Ingredient Review*. 2011.

42. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Assessment of Chlorphenesin as used in cosmetics. CIR, 2012. Available from: www.cir-safety.org/sites/default/files/Chlorp092012rep.pdf.

43. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Sodium Dehydroacetate and Dehydroacetic acid. *Journal of the American College of Toxicology*. 1985; 4 (3): 123-159
44. Andersen FA. Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments – 2005/ 2005. *International Journal of Toxicology*. 2006, 25 (Suppl 2): 1-89.
45. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). Toxicological Profile for formaldehyde. 1999 jul. Available from: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp111.pdf
46. Boyer IJ, Heldreth B, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler DC, Marks Jr JG, Shank RC, Slager TJ, Snyder PW, Andersen FA. Amended Safety Assessment of Formaldehyde and Methylene Glycol as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 2013, 32 (Suppl 4): 55-325.
47. National câncer Institute (US). Imidazolidinyl Urea. 2004. Available from: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/imidazolidinylurea_508.pdf
48. Kręcis B, Chomiczewska-Skóra D, Kieć-Świerczyńska M. Preservatives as important etiologic factors of allergic contact dermatitis. *Med Pr*. 2015;66(3):327-32. doi: 10.13075/mp.5893.00176.
49. Doi T, Takeda A, Asada A, Kajimura K. Characterization of the decomposition of compounds derived from imidazolidinyl urea in cosmetics and patch test materials. *Contact Dermatitis*. 2012 Nov;67(5):284-92. doi: 10.1111/j.1600-0536.2012.02073.x.
50. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Methylisothiazolinone and Methylchlorisothiazolinone. *International Journal of Toxicology*. 1992; 11: 75-128.
51. Castanedo-Tardana MP¹, Zug KA. Methylisothiazolinone. *Dermatitis*. 2013 Jan-Feb;24(1):2-6. doi: 10.1097/DER.0b013e31827edc73.
52. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Amended Safety Assessment of Methylisothiazolinone. CIR Final Amended Report. 2014 Oct.

53. Bennett CL, Bergfeld WF, Belsito DV, Klaassen CD, Marks Jr JG, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Final Report on the Safety Assessment of Methylisothiazolinone. *International Journal of Toxicology*. 2010,
54. Lundov MD1, Opstrup MS, Johansen JD. Methylisothiazolinone contact allergy--growing epidemic. *Contact Dermatitis*. 2013 Nov;69(5):271-5. doi: 10.1111/cod.12149.
55. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Phenoxyethanol. *Journal of the American College of Toxicology*. 1990; 9 (2): 259-277
56. Andersen FA. Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments: 2007-2011. *International Journal of Toxicology*. 2011. 30 (Suppl 2) 735-1275.
57. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol*. 2008; 27 (4): 1-82.
58. Becker LC, Bergfeld WF, Belsito DV, Klaassen CD, Hill R, Leibler D, Marks JG Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Alan Andersen F. Final report of the amended safety assessment of Quaternium-15 as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2010 May;29(3 Suppl):98S-114S.
59. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final Report on the Safety Assessment of Sorbic Acid and Potassium Sorbate. *Journal of the American College of Toxicology*. 1988; 7 (6): 837-880.
60. Andersen AF. Annual Review of Cosmetic Ingredient Safety Assessments: 2005/2006. *International Journal of Toxicology*. 2008, 27 (Suppl 1): 77-142.
61. DeSalva, S. J., B. M. Kong, and Y. J. Lin. 1989. Triclosan: a safety profile. *Am. J. Dent*. 2(Spec no.):185-196.
62. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Triclosan. CIR Final Report. 2010, Dec.

63. Dhillon GS, Kaur S, Pulicharla R, Brar SK, Cledón M, Verma M, Surampalli RY. Triclosan: current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *Int J Environ Res Public Health*. 2015 May 22;12(5):5657-84. doi: 10.3390/ijerph120505657.
64. Schnuch A, Lessmann H, Geier J, Uter W. Contact allergy to preservatives. Analysis of IVDK data 1996-2009. *British Journal of Dermatology*. 2011; 164, 1316-1325.
65. Seo SB, Ryu CS, Ahn GW, Kim HB, Jo BK, Kim SH, Lee JD; Kajiuchi T. Development of a natural preservative system using the mixture of chitosan-Inula helenium L. extract. *Int J Cosmet Sci*. 2002; 24(4), 195-206.
66. Johnson W Jr, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, Marks JG Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Safety assessment of 1,2-glycols as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2012 Sep-Oct; 31(5):147S-68S.
67. Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final report on the safety assessment of Phenethyl Alcohol. *Journal Of The American College Of Toxicology*. 1990; 9(2): 165-183.
68. Johnson W Jr, Bergfeld WF, Belsito DV, Hill RA, Klaassen CD, Liebler D, Marks JG Jr, Shank RC, Slaga TJ, Snyder PW, Andersen FA. Safety assessment of alkyl glyceryl ethers as used in cosmetics. *Int J Toxicol*. 2013 Sep-Oct;32(5 Suppl):5S-21S.
69. Nostro A, Cannatelli MA, Morelli I, Musolino AD, Scuderi F, Pizzimenti F, Alonzo V. Efficiency of *Calamintha officinalis* essential oil as preservative in two topical product types. *J Appl Microbiol*. 2004; 97(2), 395-401.
70. Papageorgiou S, Varvaresou A, Tsirivas E, Demetzos C. New alternatives to cosmetics preservation. *J Cosmet Sci*. 2010; 61(2), 107-123.
71. Tsuchido T, Ahn YH, Takano M. Lysis of *Bacillus subtilis* Cells by Glycerol and Sucrose Esters of Fatty Acids. *Appl Environ Microbiol*. 1987; 53(3), 505
72. Wang YM, Van-Eys J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols, *Ann Rev Nutr* 1. 1981; 437-475.

73. Aminoff C. New carbohydrate sweeteners. In: Sugars in Nutrition. Sipple HL, McNutt KW editors. New York: Academic Press, New York. 1974; p. 135-142.
74. Mäkinen KK. Biochemical principles of the use of xylitol in medicine and nutrition with special consideration of dental aspects. Birkhäuser Verlag, Basel, 1978.
75. Ferreira AS, Barbosa NR, Silva SS. In Vivo Xylitol Primary Dermal Irritation and Phototoxicity Evaluation. Lat. Am. J. Pharm. 2009; 28 (2), 192-5.
76. Ferreira AS. Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
77. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6912, Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6912> (Acessado em: 30 de agosto de 2015).
78. WHO/FAO. Summary of toxicological data of certain food additives. Twenty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series. Genova. 1997; 617: 124-147.
79. Uhari M, Kontiokari T, Koskela M, Niemelä M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial. Br Med J. 1996; 313: 1180-1184.
80. Mäkinen KK. Latest dental studies on xylitol and mechanism of action of xylitol in caries limitation. In "Progress in Sweeteners" (Grenby TH, ed.), Chapter 13, Elsevier, London: 1989.
81. Mäkinen KK. Dietary prevention of dental caries by xylitol - clinical effectiveness and safety. J Appl Nutr. 1992; 44:16-28.
82. Tapiainen et al. Effect of xylitol on growth of Streptococcus pneumoniae in the presence of fructose and sorbitol. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 166-169, 2001
83. Tapiainen T, Kontiokari T, Sammalkivi L, Heimo II, Koskela M, Uhari M. Effect of Xylitol on Growth of Streptococcus pneumoniae in the Presence of Fructose and

Sorbitol. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(1),166-9.

84. Kontiokari et al. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 1823.

85. Han et al. Xylitol inhibits inflammatory cytokine expression induced by lipopolysaccharide from *S. mutans*. *Clin Diag Lab Immunol* 2005; 12: 1285-1291.

86. Söderling E, Alaräisänen L, Scheinin A, Mäkinen KK. Effect of xylitol and sorbitol on polysaccharide production by and adhesive properties of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 1987; 21(2):109-16.

87. Trahan L, Bareil M, Gauthier L, Vadeboncoeur C. Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 1985; 19(1), 53-63.

88. Zarif L, Greiner J, Pace S, Riess JG. Synthesis of perfluoroalkylated xylitol ethers and esters: new surfactants for biomedical uses. *J. Med. Chem*. 1990; 33, 1262–1269.

89. Pereda MCV, Polezel MA, Dieamant GC, Nogueira C, Mussi L, Rossan MR, Correia CRD, Camilo NS. Xylitol esters and ethers applied as alternative emulsifiers, solvents, co-emulsifiers and preservative systems for pharmaceutical and cosmetic products. *Chemyunion Química Ltda*. WO2010046726. 2008.

90. Pereda MCV, Polezel MA, Dieamant GC, Nogueira C, Rossan MR, Correia CRD, Camilo NS, Silveira JEPS. Topical Composition comprising Phosphates, Phosphonates, Phosphites and Phosphoramidates for topical application to hair and/or skin. *Chemyunion Química Ltda*. WO2011055165. 2009.

91. Wolf R, Wolf D, Tunzun B, Tuzun Y. Contact Dermatitis to Cosmetics. *Clin Dermatol*. 2001; 19: 502-515.

92. Cohen DE. Contact Dermatitis: a quarter century perspective. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 51: 60-62.

93. Duarte I, Lage ACC. Frequency of dermatoses associated with cosmetics. *Contact Dermatitis*. 2007; 56: 211-213.

94. Pauwels M, Rogiers V. Human health safety evaluation of cosmetics in the EU: A legally imposed challenge to science. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010; 243: 260-274.
95. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. Brasília (DF); 2012.
96. Rogiers V, Balls M, Basketter D, Berardesca E, Edwards C, Elsner P, Ennen J, Lévêque JL, Lóden M, Masson P, Parra J, Paye M, Piérard G, Rodrigues L, Schaefer H, Salter D, Zuang V. The Potential Use of Non-invasive Methods in the Safety Assessment of Cosmetic Products. *Altern Lab Anim*. 1999 Jul-Aug; 27(4):515-37.
97. Brasil. Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008. Procedimentos para o uso científico de animais. *Diário Oficial da União* 10 out 2008.
98. Robinson MK, Cohen C, de Fraissinette Ade B, Ponec M, Whittle E, Fentem JH. Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products. *Food Chem Toxicol*. 2002 May;40(5):573-92.
99. ICCVAM [Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods]. 2000. ICCVAM Authorization Act of 2000 (Public Law 106-545). Available from: <http://www.access.gpo.gov/nara/publaw/106publ.html>
100. Kojima H. JaCVAM: An organization supporting the validation and peer review of new alternatives to animal testing, *AATEX*. 2007; 14, special issue, 483. 19.
101. Presgrave O, Moura W, Caldeira C, Delgado I, Ballotin L, Granjeiro JM. Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) e Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA): Perspectivas para a Validação de Métodos Alternativos. Porto Alegre: CBTOX, 2013.
102. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol*. 1985; 23, 287–291.
103. Cardoso CMV, Sajo MG. Vascularização foliar e a identificação de espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae) da bacia hidrográfica do Rio Tibagi, PR. *Rev. Bras. Bot.* 2004; v.27, n.1.

104. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000 Nov 20; 455(1-2):29-60.
105. Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem. Toxicol.* 2004; v. 42, p. 2029-2035.
106. Umbuzeiro GA, Vargas VMF, Felzenszawalb I, Henriques JAP, Varanda E. Orientações básicas de execução de Testes de Mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium*. SBMCTA, Série Documentos. 2004; N1.
107. Nigsch F, Macaluso NJ, Mitchell JB, Zmuidinavicius D. Computational toxicology: an overview of the sources of data and of modelling methods. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 Jan;5(1):1-14.
108. Walker CH. Ecotoxicity testing: science, politics and ethics. *Altern Lab Anim.* 2008 Feb; 36(1):103-12.
109. Pizzo F, Lombardo A, Manganaro A, Benfenati E. In silico models for predicting ready biodegradability under REACH: a comparative study. *Sci Total Environ.* 2013 Oct 1; 463-464:161-8.
110. Rusyn I, Sedykh A, Low Y, Guyton K.Z. and Tropsha, A. Predictive Modeling of Chemical Hazard by Integrating Numerical Descriptors of Chemical Structures and Short-term Toxicity Assay Data. *Toxicol Sci.* 2012; 127(1), 1.
111. Verma RP, Matthews EJ. An in silico expert system for the identification of eye irritants. *SAR QSAR Environ Res.* 2015; 26(5):383-95.
112. Hisaki T, Aiba Née Kaneko M, Yamaguchi M, Sasa H, Kouzuki H. Development of QSAR models using artificial neural network analysis for risk assessment of repeated-dose, reproductive, and developmental toxicities of cosmetic ingredients. *J Toxicol Sci.* 2015; 40(2):163-80.
113. Aiba née Kaneko M, Hirota M, Kouzuki H, Mori M. Prediction of genotoxic potential of cosmetic ingredients by an in silico battery system consisting of a combination of an expert rule-based system and a statistics-based system. *J Toxicol Sci.* 2015 Feb; 40(1):77-98.

114. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991 May 15;51(10):2515-20.
115. Fernandes MJB, Limas C, Rossi MH, Gonçalves E, Simoni IC. Cytotoxicity of subfractions and compounds from *Polymnia sonchifolia*. *Braz. J. Microbiol.* 2005; 36: 338-341.
116. Ceridono M, Tellner P, Bauer D, Barroso J, Alépée N, Corvi R, De Smedt A, Fellows MD, Gibbs NK, Heisler E, Jacobs A, Jirova D, Jones D, Kandárová H, Kasper P, Akunda JK, Krul C, Learn D, Liebsch M, Lynch AM, Muster W, Nakamura K, Nash JF, Pfannenbecker U, Phillips G, Robles C, Rogiers V, Van De Water F, Liminga UW, Vohr HW, Wattrelos O, Woods J, Zuang V, Kreysa J, Wilcox P. ECVAM - The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: Practical experience and implications for phototoxicity testing – The report of an ECVAM–EFPIA workshop. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012; 63(3), 480-8.
117. Holzhütter HG. A general measure of in vitro phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the in vivo phototoxicity of chemicals. *ATLA.* 1997; 25, 445-462
118. Liebsch M, Spielmann H. INVITTOX Protocol 78: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. ECVAM DB-ALM. 1998.
119. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Draft Proposal for a New Guideline. In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. 432. 2002.
120. ECVAM. European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM). Validation & regulatory acceptance. Available from: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance/topical-toxicity/eye-irritation#2-test-methods-under.
121. Marquardt C, Matuschek E, Bölke E, Gerber PA, Peiper M, Seydlitz-Kurzbach J, Buhren BA, van Griensven M, Budach W, Hassan M, Kukova G, Mota R, Höfer D, Orth K, Fleischmann W. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). *Eur J Med Res.* 2010

May 18;15(5):204-9.

122. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Bovine Corneal Opacity test Method (BCOP), EU B.47, OECD 437. 2009

123. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983 May;113(3-4):173-215.

124. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects, Bacterial Reverse Mutation Test, 471.1997.

125. Claxton LD, Allen J, Auletta A, Mortelmans K, Nestmann E, Zeiger E. Guide for the Salmonella typhilmurium/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. *Mutation Research*. 1987; 189(2), 83–91.

126. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guidelines for testing of chemicals. OECD 301 B. CO₂ evolution test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France. 1993.

127. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988 Jun;124(6):869-71.

128. Marzulli FN, Maibach HI. Contact allergy: predictive testing in man. *Contact Dermatitis*. 1976 Feb; 2(1):1-17.

129. Politano VT, Api AM. The Research Institute for Fragrance Materials' human repeated insult patch test protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008 Oct;52(1):35-8. doi: 10.1016/j.yrtph.2007.11.004. Epub 2007 Nov 28.

130. Cordain L, Lindeberg S, Hurtado M, Hill K, Eaton SB, Brand-Miller J. Acne vulgaris: a disease of Western civilization. *Arch Dermatol*. 2002 Dec;138(12):1584-90.

131. Schwindt DA¹, Wilhelm KP, Maibach HI. Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *J Invest Dermatol*. 1998 Sep;111(3):385-9.

132. Dobrev H. Use of cutometer to assess epidermal hydration. *Skin Res Tech.* 2000; 6: 239-244.
133. Oba A, Gomi T, Graves C, Pearse A, Edwards CA. A non-invasive method for measuring invisible subcutaneous UV Damage. In: IFSCC Congress. Edinburg: 2002; 22.
134. Leonardi GR, Gaspar LR, Maia Campos PM. Application of a non-invasive method to study the moisturizing effect of formulations containing vitamins A or E or ceramide on human skin. *J Cosmet Sci.* 2002 Sep-Oct;53(5):263-8.
135. Egawa M, Tagami H. Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration. *British Journal of Dermatology.* 2008; 158 (2): 251–260.
136. Egawa M, Iwaki H. In vivo evaluation of the protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy. *Skin Research and Technology* 2008; 14: 1–8.
137. Bielfeldt S, Schoder V, Ely U, van der Pol A, de Sterke J, Wilhelm KP. Assessment of Human Stratum Corneum Thickness and its Barrier Properties by In-Vivo Confocal Raman Spectroscopy. *IFSCC Magazine.* 2009; 12, 1.
138. Shahtalebi MA, Ghanadian M, Farzan A, Shiri N, Shokri D, Fatemi SA. Deodorant effects of a sage extract stick: Antibacterial activity and sensory evaluation of axillary deodorancy. *J Res Med Sci.* 2013 Oct;18(10):833-9.
139. Kroes R, Renwick AG, Feron V, Galli CL, Gibney M, Greim H, Guy RH, Lhuguenot JC, van de Sandt JJ. Application of the threshold of toxicological concern (TTC) to the safety evaluation of cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol.* 2007 Dec;45(12):2533-62.
140. Lapenna S, Worth A. Analysis of the Cramer classification scheme for oral systemic toxicity - implications for its implementation in Toxtree. *JCR Scientific and Technical Reports.* European Union; 2011. Available from: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/laboratories-research/predictive_toxicology/doc/EUR_24898_EN.pdf

141. Osório RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of Endodontic Materials. *Journal of Endodontics*. 1998; 24: 91-96.
142. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*. 1985; 24(2-3): 119-
143. OECD. Organization for Economic Co-operation and Development Environment Directorate Joint Meeting of the Chemical Committee and The Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology - Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests No. 129. 2010.
144. Ahmed, M. Acute Toxicity (Lethal Dose 50 Calculation) of Herbal Drug Somina in Rats and Mice. *Pharmacology & Pharmacy*, 2015, 6, 185-189. <http://dx.doi.org/10.4236/pp.2015.63019>
145. Carvalho CM, Menezes PFC, Letenski GC, Praes CEO, Feferman IHS, Lorencini M. In vitro induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. *Int J Cosmet Sci* 2012 Apr 30; 34(2):176-82.
146. Kim K, Park H, Lim KM. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol Res*. 2015 Jun; 31(2): 97–104.
147. Schrage A, Gamer AO, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Experience with the HET-CAM method in the routine testing of a broad variety of chemicals and formulations. *Altern Lab Anim*. 2010 Mar;38(1):39-52.
148. Gilleron L, Coecke S, Sysmans M, Hansen E, Van Oproy S, Marzin D, Van Cauteren H, Vanparys P. Evaluation of a modified HET-CAM assay as a screening test for eye irritancy. *Toxicol In Vitro*. 1996 Aug; 10(4):431-46.
149. Davis EC, Callender VD. A review of acne in ethnic skin: pathogenesis, clinical manifestations, and management strategies. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010 Apr;3(4):24-38.
150. Rudramurthy SM, Honnavar P, Dogra S, Yegneswaran PP, Handa S, Chakrabarti A. Association of *Malassezia* species with dandruff. *Indian J Med Res*. 2014 Mar;139(3):431-7.

151. Gomes AL, Langer CM, Oliveira EC, Vairoletto L. Diferentes tipos de pele: diferentes necessidades cosméticas. In: Anais do Congresso Nacional de Cosmetologia. São Paulo. 1998; 12: 220-231.
152. Tachinardi F, Sá Dias TC, Picirili CAD, Gomes AL, Arruda R. Avaliação sensorial de produtos cosméticos em pele. In: XVII COLAMIQC. Cusco: 2005.

Apêndice 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Inciso II-11
da Resolução nº 196, de 10.10.1996 do Conselho Nacional de
Saúde/Ministério da Saúde

AVALIAÇÃO EM HUMANOS DA ACEITABILIDADE CUTÂNEA E DA APRECIABILIDADE COSMÉTICA DE UM
PRODUTO COSMÉTICO SOB CONDIÇÕES NORMAIS DE USO

Teste Em Uso Sob Controle Dermatológico

Estudo:	Voluntário:
---------	-------------

Fui convidado(a) pela EVIC Brasil, situada na Av. Indianópolis, 1455 – Planalto Paulista / São Paulo, a participar de um estudo a ser realizado com grupo de voluntários.

Tenho a liberdade de recusar a minha participação ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo.

Atesto que recebi orientações e informações sobre o teste do qual concordei participar.

OBJETIVO DO ESTUDO

Avaliação em humanos da eficácia, da oleosidade da pele, da aceitabilidade cutânea e ocular (sinais clínicos/sensações de desconforto) e da apreciabilidade cosmética de um produto cosmético sob condições normais de uso.

RESUMO DA METODOLOGIA

As pessoas que constituem o grupo de estudo são aquelas com idade de 12 a 45 anos. A pesquisa será feita em 28 dias por 30 pessoas do sexo masculino, com pele mista ou oleosa, com presença de acne na face. No primeiro dia, os voluntários farão um exame clínico. Neste dia, 15 pessoas serão selecionadas para a avaliação do efeito da oleosidade da pele (sebumetria) com o equipamento Sebumeter SM810 PC. Estas permanecerão em uma sala com temperatura e umidade controladas para que as medidas instrumentais sejam realizadas. Após este procedimento, fotos da face (frontal e lateral) serão tiradas com o equipamento Visia. Antes de ir embora, todos os voluntários receberão o produto cosmético para utilizar durante 28 dias em casa e receberá instruções de quando e como aplicar o produto em casa, juntamente com uma folha de anotações diárias.

Após 28 dias, os voluntários retornarão ao Instituto para novas avaliações da pele e os voluntários selecionados em D1 realizarão novamente as medidas instrumentais e fotografias digitais. Todos responderão a um questionário a respeito dos efeitos do produto teste no instituto.

Datas das Visitas	Duração Prevista das Visitas
D1 – 1º Dia	2 a 3 horas
D28 – 28º Dia	2 a 3 horas

EXIGÊNCIAS DO ESTUDO

Comparecer às consultas e ao Instituto nas datas e horários combinados.

Não aplicação de outros produtos na área experimental;

Não alteração dos hábitos de higiene;

Não exposição intensa ao sol ou à UVA (lâmpadas UV) durante o estudo;

Não realizar tratamento com medicamentos contendo vitamina A ácida ou seus derivados, peróxido de benzóila, eritromicina, ácido azelaico,... durante o período do estudo (em caso terapêutico, exclusão deve ser prevista);

Não realizar tratamento antialérgico e/ou antiinflamatório durante o estudo (em caso terapêutico, exclusão prevista);

Não alteração dos hábitos de dieta;

Não alteração/início de tratamento hormonal.

Devo relatar ao responsável pelo meu acompanhamento, qualquer doença ou uso de medicação existente antes do início do estudo e, em caso de necessidade de uso de qualquer medicamento, entrarei em contato com o mesmo.

Se eu decidir interromper a minha participação na pesquisa, devo comunicar de forma prévia ao responsável pela Pesquisa.

RISCOS MÍNIMOS PREVISTOS

As substâncias que compõem os produtos utilizados nas pesquisas são seguras e adequadas para a finalidade a que destinam.

Os riscos previstos para este tipo de estudo é a possível manifestação de uma alergia a um determinado produto cosmético ou o possível aparecimento de uma irritação no local de aplicação, na forma de vermelhidão da pele ou coceira. Também podem ocorrer ressecamento, aquecimento, formigamento, prurido, repuxamento, queimação, lacrimejamento, alteração da cor da pele, bolha ou inchaço.

Se isto ocorrer, a aplicação do produto será suspensa, sendo colocada à disposição toda a assistência que se fizer necessária.

BENEFÍCIOS

Com esse estudo, os responsáveis pelos voluntários receberão um produto para usar em domicílio durante 28 dias.

RESSARCIMENTO DE DESPESAS

No final do estudo o voluntário receberá um ressarcimento das despesas referentes ao transporte e à alimentação.

Comprometo-me a seguir todas as instruções que me foram dadas na entrevista e que constam deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em caso de dúvidas ou qualquer intercorrência, poderei procurar a equipe técnica da EVIC BRASIL para ter a assistência que se fizer necessária, pessoalmente ou pelo telefone (11) 5581 4949.

Recebi a primeira via do presente Termo de Consentimento, assinado pelo pesquisador responsável.

Todas as informações e opiniões por mim emitidas serão tratadas de forma confidencial e será garantido o sigilo que assegure a minha privacidade e proteção da minha imagem.

Eu,....., portador do RG

No., declaro que recebi de forma clara todas as informações a respeito do estudo e concordo em participar de forma espontânea.

São Paulo, de de 20....

Assinatura do Voluntário :

Assinatura do Responsável pelo Estudo: / /

Nome Legível ou Carimbo :

Testemunha 1 : (Se Aplicável)

Nome Legível ou Carimbo :

Testemunha 2 : (Se Aplicável)

Nome Legível ou Carimbo :

Apêndice 2

Propriedades físico-químicas de moléculas conservantes

<i>Substância</i>	LogKow	Boiling Point (°C)	Melting Point (°C)	Vapour pressure (mmHg)
Xylitol	-2,55800	345,39	102,69	0,00196
Triclosan	4,66300	373,62	136,79	4,65E-006
Sorbic Acid	1,62120	219,63	24,62	0,00987
Quaternium-15	-5,92060	461,53	194,63	4,19E-009
Propylparaben	2,9789	285,14	71,81	0,000307
Phenethyl alcohol	1,5666	224,85	5,81	0,0243
Phenoxyethanol	1,10020	243,84	22,47	0,00449
Methylparaben	1,99670	252,18	51,47	0,000855
Methylisothiasolinone	-0,83230	237,75	47,48	0,031
Imidazolidinyl urea	-8,27870	869,03	349,84	5,49E-027
Formaldehyde	0,3500	9,50	-110,94	3,49E+003
Ethylparaben	2,48780	269,11	61,81	9,29E-005
Ethylhexylglycerin	2,21670	307,33	60,12	2,12E-005
Dehydroacetic acid	-1,30570	347,32	103,36	1,07E-006
Caprylyl Glycol	1,67350	253,11	23,77	0,00163
Butylparaben	3,4700	300,26	81,45	0,000251
Benzyl Alcohol	1,07550	205,65	-5,43	0,0535
Benzoic acid	1,87440	249,51	48,85	0,00298
IPBC	2,4542	300,88	87,99	0,00186
DMDM-Hydantoin	-2,3729	411,53	171,27	1,06E-009

Resultados da avaliação das substâncias de mercado para sensibilização cutânea, irritação cutânea e reação de Michael

Substância	Sensibilização	Reação de Michael	Irritação cutânea
Xylitol	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Triclosan	Nenhum alerta	Não reativo	Não corrosivo para a pele
Sorbic Acid	Alerta para acceptor de Michael	Acceptor de Michael	Não irritante/ corrosivo
Quaternium-15	Alerta para SN2 ou Acyl	Não reativo	Desconhecido
Propylparaben	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Phenethyl alcohol	Nenhum alerta	Não reativo	Irritante para a pele
Phenoxyethanol	Nenhum alerta	Não reativo	Irritante para a pele
Methylparaben	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Methyl isothiazolinone	Alert para SN2	Não reativo	Não irritante para a pele
Imidazolidinyl urea	Alert para Acyl	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Formaldehyde	Alerta para base de Schiff	Não reativo	Irritante ou corrosive para a pele
Ethylparaben	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Ethylhexyl glycerin	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Dehydroacetic acid	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Caprylyl Glycol	Nenhum alerta	Não reativo	Irritante para a pele
Butylparaben	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Benzyl Alcohol	Nenhum alerta	Não reativo	Irritante para a pele
Benzoic acid	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
IPBC	Alerta para Acyl	Não reativo	Irritante para a pele
DMDM-Hydantoin	Alerta para Acyl	Não reativo	Não corrosivo para a pele

Resultados da avaliação das substâncias de mercado para irritação ocular, regras de Cramer e Kroes TTC.

Substância	Irritação ocular	Regras de Cramer	Kroes TTC
Xylitol	Não corrosivo ocular	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Triclosan	Não corrosivo ocular	Alto (Classe III)	Preocupação de segurança não esperada
Sorbic Acid	Não corrosivo ocular	Alto (Classe III)	Preocupação de segurança não esperada
Quaternium-15	Desconhecido	Alto (Classe III)	Risco negligenciável
Propylparaben	Não corrosivo ocular	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Phenethyl alcohol	Desconhecido	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Phenoxyethanol	Desconhecido	Intermediário (Classe II)	Preocupação de segurança não esperada
Methylparaben	Não corrosivo ocular	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Methylisothiazolinone	Desconhecido	Alto (Classe III)	Risco negligenciável
Imidazolidinyl urea	Não corrosivo ocular	Alto (Classe III)	Risco negligenciável
Formaldehyde	Desconhecido	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Ethylparaben	Não corrosivo ocular	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Ethylhexylglycerin	Não corrosivo ocular	Alto (Classe III)	Preocupação de segurança não esperada
Dehydroacetic acid	Não corrosivo ocular	Alto (Classe III)	Preocupação de segurança não esperada
Caprylyl Glycol	Sérias lesões oculares	Intermediário (Classe II)	Preocupação de segurança não esperada
Butylparaben	Não corrosivo ocular	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Benzyl Alcohol	Desconhecido	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
Benzoic acid	Não corrosivo ocular	Baixo (Classe I)	Preocupação de segurança não esperada
IPBC	Desconhecido	Alto (Classe III)	Risco negligenciável
DMDM-Hydantoin	Desconhecido	Alto (Classe III)	Risco negligenciável

Resultados da avaliação das substâncias de mercado para teste de micronúcleo e mutagenicidade/ carcinogenicidade

Substância	Micronúcleo	Mutagenicidade/
Xylitol	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Triclosan	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Alerta estrutural para carcinogenicidade não-genotóxica
Sorbic Acid	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Quaternium-15	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Alerta estrutural para carcinogenicidade genotóx./ Negativo para não genotóxica nongenotoxic carcinogenicity
Propylparaben	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Phenethyl alcohol	Nenhum alerta para genotoxicidade (Classe II)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Phenoxyethanol	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Methylparaben	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Methylisothiazolinone	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Imidazolidinyl urea	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Alerta estrutural para carcinogenicidade genotóxica
Formaldehyde	Nenhum alerta para genotoxicidade (Classe II)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Ethylparaben	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Ethylhexylglycerin	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Dehydroacetic acid	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Caprylyl Glycol	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Butylparaben	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Benzyl Alcohol	Nenhum alerta para genotoxicidade (Classe II)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
Benzoic acid	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
IPBC	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Alerta estrutural para carcinogenicidade genotóx./ Negativo para não genotóxica
DMDM-Hydantoin	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Alerta estrutural para carcinogenicidade genotóx./ Negativo para não genotóxica

Propriedades físico-químicas de moléculas derivadas de xilitol

Substância	LogKow	Boiling Point (°C)	Melting Point (°C)	Vapour pressure (mmHg)
(Mono)Xylitol				
Phosphate Ester	-3,23	468,27	89,13	5,10E-011
(Di)Xylitol				
Phosphate Ester	-6,10	480,00	90,27	2,06E-011
(Tri)Xylitol				
Phosphate Ester	-8,97	480,00	90,27	2,06E-011
C-8 Xylitol				
Monoester	0,80000	420,94	155,99	3,25E-010

Resultados da avaliação das substâncias derivadas de xilitol para sensibilização cutânea, irritação cutânea e reação de Michael

Substância	Sensibilização	Reação de Michael	Irritação cutânea
(Mono)Xylitol	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Phosphate Ester			
(Di)Xylitol	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Phosphate Ester			
(Tri)Xylitol	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Phosphate Ester			
C-8 Xylitol	Nenhum alerta	Não reativo	Não irritante/ corrosivo
Monoester			

Resultados da avaliação das substâncias derivadas de xilitol para irritação ocular, regras de Cramer e Kroes TTC.

Substância	Irritação ocular	Regras de Cramer	Kroes TTC
(Mono)Xylitol	Não corrosivo ocular	Alto	Dados específicos de toxicidade necessários
Phosphate Ester		(Classe III)	
(Di)Xylitol Phosphate Ester	Não corrosivo ocular	Alto	Dados específicos de toxicidade necessários
		(Classe III)	
(Tri)Xylitol Phosphate Ester	Não corrosivo ocular	Alto	Dados específicos de toxicidade necessários
		(Classe III)	
C-8 Xylitol Monoester	Não corrosivo ocular	Intermediário	Preocupação de segurança não esperada
		(Classe II)	

Resultados da avaliação das substâncias derivadas de xilitol para teste de micronúcleo e mutagenicidade/ carcinogenicidade

Substância	Micronúcleo	Mutagenicidade/ Carcinogenicidade
(Mono)Xylitol Phosphate Ester	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
(Di)Xylitol Phosphate Ester	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
(Tri)Xylitol Phosphate Ester	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não
C-8 Xylitol Monoester	Alerta para genotoxicidade (Classe I)	Negativo para carcinogenicidade genotóxica ou não

Resultados da avaliação das substâncias derivadas de xilitol para biodegradabilidade imediata

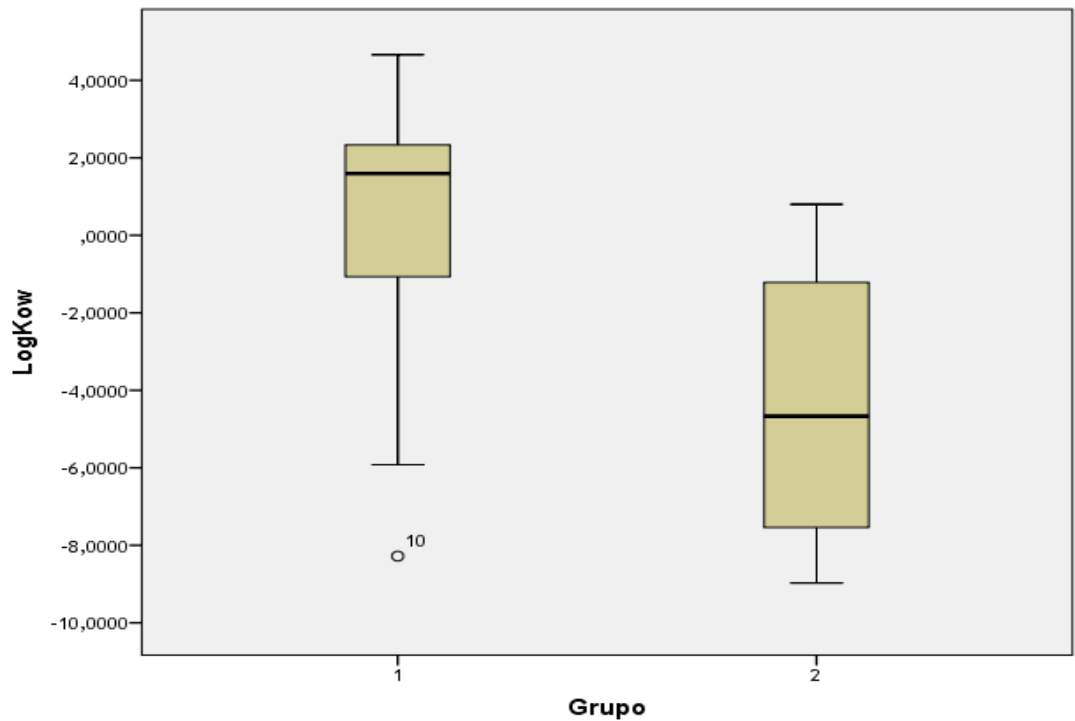
<i>Modelo de predição in silico</i>	(Mono) Xylitol Phosphate Ester	(Di) Xylitol Phosphate Ester	(Tri) Xylitol Phosphate Ester	C-8 Xylitol Monoester
Toxtree – START*	Classe I	Classe I	Classe I	Classe I
OECD Toolbox - Biowin	Prontamente biodegradável	Prontamente biodegradável	Prontamente biodegradável	Prontamente biodegradável
Vega - SARpy	Possivelmente prontamente biodegradável	Não prontamente biodegradável	Não prontamente biodegradável	Não prontamente biodegradável

*Classe 1 – Composto prontamente biodegradável

Apêndice 3

Análise estatística dos compostos conservantes e das moléculas derivadas de xiltiol

Análise estatística de LogKoW



Comparação dos grupos para LogKoW, conforme análise estatística

Estatísticas de grupo para LogKoW

Grupo		N	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média
LogKow	1	19	0,87	2,50	0,57
	2	4	-4,38	4,17	2,09

Teste de amostras independentes para LogKoW

	Teste de Levene para igualdade de variações		teste t para Igualdade de Médias						
	F	Sig.	T	Df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% IC da diferença	
								Inferior	Superior
Variações iguais assumidas	1,96	0,18	3,40	21	0,003	5,25	1,54	2,04	8,46
Variações iguais não assumidas			2,43	3,47	0,082	5,25	2,16	-1,14	11,64

Skin sensitisation	Grupo		Total
	1	2	
Não alerta	13	4	17
Alerta	7	0	7
Total	20	4	24

Testes de chi-quadrado para os dados de sensibilização

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Chi-quadrado de Pearson	1,976 ^a	1	0,160		
Correção de continuidade ^b	0,645	1	0,422		
Razão de probabilidade	3,077	1	0,079		
Fisher's Exact Test				0,283	0,224
Associação Linear por Linear	1,894	1	0,169		
N de Casos Válidos	24				

a. 2 células (50,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 1,17.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabulação cruzada dos dados de irritação cutânea

Skin irritation	Grupo		Total
	1	2	
Não Irritativo	14	4	18
Irritativo	6	0	6
Total	20	4	24

Testes de chi-quadrado para os dados de irritação cutânea

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Chi-quadrado de Pearson	1,600 ^a	1	0,206		
Correção de continuidade ^b	0,400	1	0,527		
Razão de probabilidade	2,558	1	0,110		
Fisher's Exact Test				0,539	0,288
Associação Linear por Linear	1,533	1	0,216		
N de Casos Válidos	24				

a. 2 células (50,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 1,00.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Tabulação cruzada dos dados de mutagenicidade/carcinogenicidade

Mutagenicity_Carcinogenicity	Grupo		Total
	1	2	
Não alerta	15	3	18
Alerta	5	1	6
Total	20	4	24

Testes de chi-quadrado para os dados de mutagenicidade/ carcinogenicidade

	Valor	df	Sig. Assint. (2 lados)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)
Chi-quadrado de Pearson	0,000 ^a	1	1,000		
Correção de continuidade ^b	0,000	1	1,000		
Razão de probabilidade	0,000	1	1,000		
Fisher's Exact Test				1,000	0,749
Associação Linear por Linear	0,000	1	1,000		
N de Casos Válidos	24				

a. 2 células (50,0%) esperam contagem menor do que 5. A contagem mínima esperada é 1,00.

b. Computado apenas para uma tabela 2x2

Classificações segundo Cramer

Grupo		N	Mean Rank	Sum of Ranks
	1	20	11,68	233,50
Cramer rules	2	4	16,63	66,50
	Total	24		

Teste estatístico^a para Regras de Cramer

Teste estatístico	Cramer rules
Mann-Whitney U	23,500
Wilcoxon W	233,500
Z	-1,410
Sig. Assint. (2 caudas)	0,159
Sig exata [2*(Sig. de 1-cauda)]	0,210 ^b

a. Variável de agrupamento: Grupo

b. Não corrigido para vínculos.

p-valores conforme teste estatístico

Teste estatístico	Variável	p-valor
Teste Exato de Fisher	Skin sensitisation	28
	Skin irritation	54
	Mutagenicity_Carcinogenicity	100
Teste Mann-Whitney	Cramer rules	16
Teste T das médias	LogKow	0,3

Apêndice 4

Quantidade diária de CO₂ liberado (mg) durante o período de incubação de 15 dias para os ésteres de fosfato de xilitol

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		Ésteres de Fosfato de Xilitol		Inibição
	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1
1	27,73	23,27	11,39	12,60	37,24
2	53,85	50,44	31,30	30,42	53,85
3	2,04	0,28	0	0	43,51
6	49,50	44,00	22,55	23,10	35,09
8	40,59	41,47	26,18	25,41	53,02
9	0	0	0	0	29,37
10	24,81	22,28	15,90	15,57	28,44
15	0	0	21,23	22,67	39,27

Total de CO₂ liberado (mg) durante o período de incubação de 15 dias para os ésteres de fosfato de xilitol

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		Ésteres de Fosfato de Xilitol		Inibição
	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1
1	27,73	23,27	11,39	12,60	37,24
2	75,57	73,70	42,68	43,01	91,08
3	77,61	73,98	42,68	43,01	134,59
6	127,11	117,98	65,23	66,11	169,68
8	167,70	159,45	91,41	91,52	222,70
9	167,70	159,45	91,41	91,52	252,07
10	192,50	181,72	107,31	107,09	280,50
15	192,50	181,72	128,54	129,75	319,77

Porcentagem de CO₂ liberado durante o período de incubação de 15 dias para os ésteres de fosfato de xilitol

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		Ésteres de Fosfato de Xilitol		Inibição
	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1
1	9,88	10,58	10,35	11,45	10,35
2	34,36	33,51	38,81	39,11	38,81
3	35,28	33,63	38,81	39,11	38,81
6	57,79	53,63	59,31	60,11	59,31
8	76,24	72,49	83,12	83,22	83,12
9	76,24	72,49	83,12	83,22	83,12
10	87,52	82,62	97,58	97,37	97,57
15	87,52	82,62	100,00	100,00	100,00

Quantidade diária de CO₂ liberado (mg) durante o período de incubação de 15 dias para o Monoéster de C-8 Xilitol

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		Monoéster de C-8 Xilitol		Inibição
	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1
2	23,32	23,76	25,41	23,76	31,79
5	43,29	45,05	31,30	28,88	48,13
7	33,72	34,38	28,22	23,27	29,21
9	36,08	35,42	13,97	12,10	28,71
14	26,13	23,82	9,52	9,19	21,62
19	23,21	24,53	8,47	8,69	15,18
24	23,10	24,20	5,17	6,16	14,30
28	11,50	13,48	5,34	7,21	12,49

Total de CO₂ liberado (mg) durante o período de incubação de 15 dias para o Monoéster de C-8 Xilitol

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		Monoéster de C-8 Xilitol		Inibição
	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1
2	23,32	23,76	25,41	23,76	31,79
5	66,61	68,81	56,71	52,64	79,92
7	100,32	103,18	84,92	75,90	109,12
9	136,40	138,60	98,89	88,00	137,83
14	162,53	162,42	108,41	97,19	159,45
19	185,74	186,95	116,88	105,88	174,63
24	208,84	211,15	122,04	112,04	188,93
28	220,33	224,62	127,38	119,24	201,41

Porcentagem de CO₂ liberado durante o período de incubação de 15 dias para o Monoéster de C-8 Xilitol

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		Monoéster de C-8 Xilitol		Inibição
	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1	CO ₂ – 2	CO ₂ – 1
2	10,60	10,80	23,10	21,60	9,64
5	30,28	31,28	51,56	47,86	24,22
7	45,61	46,91	77,21	69,01	33,07
9	62,01	63,01	89,92	80,01	41,77
14	73,88	73,84	98,57	88,37	48,33
19	84,44	84,99	100,00	96,27	52,93
24	94,94	95,99	100,00	100,00	57,26
28	100,00	100,00	100,00	100,00	61,04

Apêndice 5

Indução de mutagenicidade dos Ésteres de Fosfato de Xilitol em cepas de *Salmonella typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

Ésteres de Fosfato de Xilitol		his+ -S9			his+ +S9		
Cepa	µg/placa	Média ^a	DP ^b	MI ^c	Média ^a	DP ^b	MI ^c
TA100	0	90,33	15,50	-	103,40	16,53	-
	1000	101,67	4,04	1,13	99,00	7,00	0,96
	2000	10,67	16,04	1,16	117,00	5,00	1,13
	3000	86,67	4,73	0,96	93,00	11,53	0,90
	4000	89,67	8,50	0,99	104,67	16,44	1,01
	5000	91,00	8,66	1,01	102,67	22,01	0,99
TA98	0	13,8	3,56	-	37,00	9,00	-
	1000	15,33	3,21	1,11	33,33	2,08	0,90
	2000	19,00	3,61	1,38	30,33	3,06	0,82
	3000	18,00	5,29	1,30	30,33	5,51	0,82
	4000	13,67	3,79	0,99	39,00	1,73	1,05
	5000	15,67	1,53	1,14	34,33	6,35	0,93
TA97	0	96,00	4,00	-	94,00	14,42	-
	1000	106,33	9,07	1,11	86,33	24,66	0,92
	2000	82,67	7,37	0,86	111,33	11,06	1,18
	3000	86,00	12,12	0,90	98,67	11,85	1,05
	4000	88,67	2,89	0,92	112,67	4,04	1,20
	5000	82,33	12,90	0,86	107,33	11,68	1,14
TA102	0	270,67	9,45	-	357,00	15,10	-
	1000	291,33	23,18	1,08	366,00	4,36	1,03
	2000	275,33	51,16	1,02	365,67	19,66	1,02
	3000	214,00	74,05	0,79	360,33	26,63	1,01
	4000	233,67	19,55	0,86	335,33	25,15	0,94
	5000	230,00	16,46	0,85	356,33	10,69	1,00
TA1535	0	10,33	2,08	-	8,67	3,21	-
	1000	9,33	0,58	0,90	5,67	1,53	0,65
	2000	10,00	2,00	0,97	6,67	2,08	0,77
	3000	7,33	4,16	0,71	12,00	5,00	1,38
	4000	7,00	0	0,68	9,67	1,15	1,12
	5000	9,33	1,53	0,90	7,00	1,00	0,81

^amédia de revertentes his+/ placa

^bDP: Desvio Padrão

^cÍndice de Mutagenicidade (MI): Relação entre a média de colônias revertentes his+/ placa de amostra teste e a média de colônias revertentes his+/ placa da mutação espontânea de cada linhagem bacteriana

Indução de mutagenicidade de Monoéster de C-8 Xilitol em cepas de *Salmonella typhimurium* sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

Monoéster de C-8 Xilitol		his+ -S9			his+ +S9		
Cepa	µg/placa	Média ^a	DP ^b	MI ^c	Média ^a	DP ^b	MI ^c
TA100	0	102,67	3,79	-	104,4	31,41	-
	200	91,00	7,81	0,89	121,00	3,61	1,16
	400	82,67	10,41	0,81	116,33	6,03	1,11
	600	81,33	9,71	0,79	125,67	2,52	1,20
	800	74,00	5,57	0,72	115,33	10,97	1,10
	1000	41,33	10,21	0,40	153,00	21,93	1,47
TA98	0	14,2	3,56	-	18,4	4,72	-
	200	12,00	2,65	0,85	14,32	2,89	0,78
	400	11,33	2,08	0,80	18,00	4,58	0,98
	600	9,33	6,03	0,66	18,00	2,65	0,98
	800	8,33	2,08	0,59	14,67	2,52	0,80
	1000	8,00	1,73	0,56	8,67	6,03	0,47
TA97	0	134,33	14,19	-	125,00	15,00	-
	200	72,67	21,22	0,54	126,00	7,21	1,01
	400	76,67	10,69	0,57	115,00	3,00	0,92
	600	72,67	6,66	0,54	115,33	11,02	0,92
	800	73,00	9,17	0,54	112,00	15,52	0,90
	1000	83,67	16,01	0,62	114,33	10,79	0,91
TA102	0	123,67	21,59	-	294,67	24,11	-
	200	124,00	23,07	1,00	414,00	76,86	1,40
	400	135,00	15,52	1,09	372,33	45,61	1,26
	600	106,67	18,58	0,86	375,33	54,01	1,27
	800	92,67	30,89	0,75	344,67	24,85	1,17
	1000	123,33	12,66	1,00	342,00	46,52	1,16
TA1535	0	359,33	16,17	-	10,00	2,65	-
	200	269,00	69,55	0,75	12,33	2,52	1,23
	400	224,33	20,84	0,62	7,33	1,15	0,73
	600	225,33	29,14	0,63	15,33	6,66	1,53
	800	179,67	19,55	0,50	6,00	1,00	0,60
	1000	142,33	16,5	0,40	9,67	1,53	0,97

^amean of revertants his+ / plate

^bSD: standard deviation

^cMutagenic index (MI): ratio of the his+ induced with samples/spontaneous his+ in the negative control.

Negative control was DMSO. Positive controls and their MI, with and without S9 mix, respectively, were:

AFB1 (4.15) and NaN3 (14.19) for TA100, AFB1 (11.92) and 4NQO (22.35) for TA98; AFB1 (6.20) and 4NQO (8.71) for TA97, AFB1 (3.26) and 4NQO (4.65) for TA102, and AFB1 (140.32) and NaN3 (2.40) for TA1535.

Apêndice 6

Graduação dos fenômenos observados em relação ao tempo para os Ésteres de Fosfato de Xilitol (100%)

Fenômeno	Avaliação	Ovos			
		1	2	3	4
Hiperemia	Tempo (s)	85	43	56	43
	Pontuação	3	3	3	3
Hemorragia	Tempo (s)	105	73	66	54
	Pontuação	3	3	3	3
Coagulação	Tempo (s)	150	90	112	115
	Pontuação	1	3	3	3
Pontuação Média		8,5			

Graduação dos fenômenos observados em relação ao tempo para o Monoéster de C-8 Xilitol (100%)

Fenômeno	Avaliação	Ovos			
		1	2	3	4
Hiperemia	Tempo (s)	26	25	22	23
	Pontuação	5	5	5	5
Hemorragia	Tempo (s)	31	28	25	30
	Pontuação	5	7	7	7
Coagulação	Tempo (s)	197	87	58	135
	Pontuação	5	7	7	5
Pontuação Média		17,5			

Apêndice 7

Aceitabilidade cutânea – Reações e Sensações de Desconforto

Avaliação da aceitabilidade cutânea de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=31).

Reações/sensações de desconforto	Intensidade	% de participantes reativos
Lacrimejamento	-	-
Ardência	Leve	3
Pinicamento	-	-
Ressecamento	Leve	3
Formigamento	-	-
Prurido	Moderado e Intenso	7
Repuxamento	-	-

Avaliação da aceitabilidade cutânea de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=32).

Reações/sensações de desconforto	Intensidade	% de participantes reativos
Lacrimejamento	-	-
Ardência	Leve	3
Pinicamento	-	-
Ressecamento	-	-
Formigamento	-	-
Prurido	Leve	3
Repuxamento	-	-

Avaliação da aceitabilidade cutânea de um shampoo e uma loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=33).

Reações/sensações de desconforto	Intensidade	% de participantes reativos
Lacrimejamento	-	-
Ardência	-	-
Pinicamento	-	-
Descamação	leve	3
Formigamento	-	-
Prurido	Leve e intensa	6
Repuxamento	-	-

Apêndice 8

Aceitabilidade ocular – Reações e Sensações de Desconforto

Avaliação da aceitabilidade ocular de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=32).

Reações/sensações de desconforto	Intensidade	% de participantes reativos
Lacrimejamento	-	-
Hiperemia	-	-
Ardência	Leve	3
Ressecamento ocular	-	-
Fotofobia	-	-
Desconforto visual (“sensação de areia”)	-	-

Avaliação da aceitabilidade ocular de um shampoo e uma loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol (n=33).

Reações/sensações de desconforto	Intensidade	% de participantes reativos
Lacrimejamento	-	-
Hiperemia	-	-
Ardência	-	-
Ressecamento ocular	-	-
Fotofobia	-	-
Desconforto visual (“sensação de areia”)	-	-

Apêndice 9

Apreciabilidade dos Participantes sobre a eficácia dos produtos contend 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Avaliação da intensidade da caspa dos participantes sobre a eficácia de um shampoo e uma loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Intensidade da caspa	Leve	Moderado	Intenso
Antes do uso do produto	45,2%	51,6%	3,2%
Após 28 dias de uso do produto	74,2%	25,8%	0%

Avaliação da apreciabilidade dos participantes sobre a eficácia de um shampoo e uma loção tônica capilar contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Parâmetro avaliado	% de respostas positivas
1. Melhora na oleosidade do couro cabeludo	74,2%
2. Melhora na oleosidade do cabelo	77,4%
3. Diminuição da caspa	87,1%
4. Redução da caspa que cai na roupa	64,5%
5. Melhora na coceira do couro cabeludo	61,3%
6. Redução da queda capilar	48,4%
7. Intenção de compra	83,9%

Avaliação da apreciabilidade dos participantes sobre a eficácia de uma loção tônica facial contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Parâmetro avaliado	% de respostas positivas
1. Melhora na oleosidade da pele	91%
2. Redução de comedões (cravos)	66%
3. Redução de espinhas	59%
4. Redução da inflamação da pele	63%
5. Aumento na hidratação da pele	84%
6. Intenção de compra	78%

Avaliação da apreciabilidade dos participantes sobre a eficácia de um bálsamo pós-barba contendo 3% de Ésteres de Fosfato de Xilitol

Parâmetro avaliado	% de respostas positivas	
	D14	D28
1. Melhora na oleosidade da pele	74%	81%
2. Redução de comedões (cravos) e espinhas	58%	74%
3. Redução da inflamação da área da barba	90%	97%
4. Área da barba menos inflamada	74%	81%
5. Redução de pinicamento após barbear-se	77%	84%
6. Redução de coceira após barbear-se	68%	77%
7. Redução da vermelhidão após barbear-se	74%	87%
8. Aumento da hidratação da pele	77%	87%
9. Intenção de compra	87%	90%

Apêndice 10

Medidas da avaliação da perda de água transepidérmica

	Hidratante sem Monoéster de C-8 Xilitol		Hidratante com Monoéster de C-8 Xilitol		Região controle sem produto	
Média dos participantes	D1	D7	D1	D7	D1	D7
Medida 1	7,2	6,7	7,5	6,8	6,4	7,1
Medida 2	7,3	7,1	8,0	7,1	6,9	6,9
Medida 3	7,5	7,2	8,0	7,2	7,0	7,0
Medida 4	7,9	7,4	8,1	7,4	7,2	7,1
Medida 5	7,9	7,6	8,3	7,4	7,4	7,0
Medida 6	8,0	7,8	8,4	7,5	7,6	7,0
Medida 7	8,1	7,9	8,4	7,7	7,5	7,0
Medida 8	7,7	8,1	8,5	7,8	7,5	7,1
Medida 9	7,5	8,1	8,4	7,8	7,7	7,1
Medida 10	7,6	8,1	8,4	8,0	7,7	7,1

Apêndice 11

Medidas da avaliação da manutenção do teor de água através da metodologia Raman

Profundidade (micron)	Quantidade de água (%)			
	Hidratante com Monoéster de C-8 Xilitol		Hidratante sem Monoéster de C-8 Xilitol	
	D1	D7	D1	D7
2	34,30	34,74	30,78	34,95
4	36,96	37,19	34,81	36,02
6	41,12	40,34	41,51	38,23
8	47,68	45,92	47,06	40,11
10	54,82	54,82	52,87	42,99
12	60,73	62,69	58,80	43,02
14	64,05	65,33	63,35	42,45
16	64,51	66,73	64,89	41,50
18	65,29	66,94	65,19	41,27
20	66,39	67,02	65,26	42,47
22	67,45	67,23	65,65	43,63
24	69,32	66,94	65,39	43,33
26	71,29	66,89	66,41	42,28
28	71,60	67,82	67,70	41,03
30	69,85	70,16	69,01	41,63

Apêndice 12

Medidas da avaliação da oleosidade através da medida de sebumetria

Participante	Tônico facial		Bálsamo pós-barba		Tônico capilar		Grupo Controle	
	D1	D28	D1	D28	D1	D28	D1	D28
1	52	22,3	96	92	267	150	324	228
2	39	29,3	142	79	35	60	365	350
3	49,7	41,7	61	32	138	140	378	239
4	69,7	29	152	121	53	21	397	273
5	196	89	197	68	71	68	360	339
6	62	42,7	147	83	20	19	362	489
7	83,7	33	201	95	48	28	135	395
8	120,7	57,3	57	33	25	17	180	400
9	223	124,7	135	77	57	30	235	46
10	142	93,7	76	49	34	29	232	334
11	152	120,3	55	30	217	38	182	199
12	86,3	52	101	50	31	20	256	261
13	48,3	32	88	60	118	75	149	430
14	209	77,7	61	20	33	23	296	129
15	92,3	27,3	81	94	/	/	/	/
16	137,7	87,3	79	181	/	/	/	/
17	95	74,3	226	186	/	/	/	/
18	184	127,3	117	39	/	/	/	/
19	123	94	253	57	/	/	/	/
20	/	/	111	82	/	/	/	/

Apêndice 13

Medidas da avaliação do efeito desodorante – *Sniff test*

Participante	8h		24h	
	Desodorante com Ésteres de Fosfato de Xilitol	Desodorante com Triclosan	Desodorante com Ésteres de Fosfato de Xilitol	Desodorante com Triclosan
1	2,3	3,3	3,7	3,0
2	3,0	3,3	4,0	5,3
3	2,7	2,3	2,3	3,3
4	2,7	3,3	3,3	4,0
5	2,0	2,7	2,7	2,3
6	2,7	2,3	5,7	4,0
7	3,0	4,0	4,0	5,3
8	2,3	3,3	4,7	2,7
9	5,7	3,3	5,3	3,7
10	2,3	2,0	2,0	2,7
11	4,3	3,0	4,0	2,7
12	5,0	2,7	6,3	4,7
13	4,0	2,7	4,3	3,0
14	2,7	2,7	2,3	2,0

Anexo 1



CEUA/Unicamp

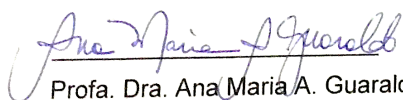
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

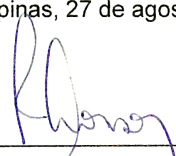
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação do perfil toxicológico de moléculas derivadas de xilitol" (protocolo nº 2812-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz / Jéssica Eleonora Pedroso Sanches Silveira, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.


O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 27 de agosto de 2012.

Campinas, 27 de agosto de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

Anexo 2

	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
	🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
CEP, 03/03/07. (Grupo III)	
PARECER PROJETO: Nº 582/2006 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto) CAAE: 0460.0.146.000-06	
I-IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE MEDIADORES IMUNOLÓGICOS, INFLAMATÓRIOS, ENDÓCRINOS E NEURAIS EM CÉLULAS DE TECIDO CUTÂNEO HUMANO E SUAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES" PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Mary Luci de Souza Queiroz INSTITUIÇÃO: HC/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/10/06	
II - OBJETIVOS	
Avaliar novos ativos de origem vegetal, especialmente da flora brasileira, capazes de modular as respostas neuro-endócrino-imunológicas da pele e que possam ser utilizados em produtos para a dermatologia estética.	
III - SUMÁRIO	
Serão utilizados nesta pesquisa material biológico, rotineiramente descartados, provenientes de blefaroplastias eletivas, de pacientes submetidos à cirurgia oftalmo-plástica no Centro Cirúrgico Ambulatorial do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Os procedimentos incluem a obtenção dos tecidos, o isolamento das linhagens celulares e as análises histológicas e imunohistoquímicas.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES	
Uma vez que a pesquisadora afirma que não haverá qualquer tipo de armazenamento de material biológico, acredito que não há mais óbices éticos.	
V - PARECER DO CEP	
O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.	
<hr/> Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13061-971 - Campinas - SP	
FGNE (019) 2766-8936 FAX (019) 2766-7187 cep@fcm.unicamp.br	
- 1 -	

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de novembro de 2006.


Prof. Dr. Carmen Sylvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DA SAÚDE DE REGIÕES METROPOLITANAS DA GRANDE SÃO PAULO
UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL IV - U.G.A. IV
HOSPITAL MATERNIDADE LEONOR MENDES DE BARROS
Av. Celso Garcia, 2477 Belenzinho São Paulo
tel. 0292-4188 fax 099-4825

São Paulo, 04 de dezembro de 2.007.

Para
Drª Silva Maria Drummond

Ref: Protocolo CEP 038/07

Prezada Senhora,

O Comitê de Ética em Pesquisa do H.M.L.M.B., vem pela presente informar que a pesquisa "Avaliação em humanos da aceitabilidade cutânea e da apreciabilidade cosmética de um produto cosmético sob condições normais de uso; Teste em uso sob controle dermatológico. Ebg 0025 e 0026" e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Versão 2: 27/11/2007), por atender a Resolução 196/96, foram aprovados.

Salientamos que a responsabilidade ética junto ao Órgão de Classe é atribuída ao pesquisador. O Consentimento Livre e Esclarecido, após assinado pelo sujeito pesquisado deverá permanecer arquivado por um período de 5 anos.

Este Comitê sente-se no direito de interromper o estudo científico, caso os princípios éticos não venham a ser cumpridos. O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais das atividades ao Comitê.

Atenciosamente,


Selma Ferreira
Coordenadora
CEP-HMLMB